

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**HIV e o sistema nervoso central:
Mecanismos de invasão e patogénese**

Flávia Adriana Mendes Antunes

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



HIV e o sistema nervoso central: Mecanismos de invasão e patogénese

Flávia Adriana Mendes Antunes

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Doutor José Miguel Azevedo Pereira, Professor
Auxiliar com Agregação**

2017

Resumo

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura de permeabilidade altamente seletiva, imprescindível na manutenção do normal funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Em condições fisiológicas, esta barreira protege o tecido neuronal de agentes infecciosos e de possíveis neurotoxinas presentes na circulação sistêmica, o que pressupõe que o comprometimento da sua integridade pode mediar a patogênese de várias doenças neurológicas, incluindo a disfunção do SNC associada ao vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1). Vários mecanismos podem estar subjacentes à neuroinvasão do HIV-1, mas o seu transporte mediado por monócitos infectados através da BHE disfuncional parece ser o principal contribuinte para o reservatório viral do cérebro. Uma vez no SNC, o HIV-1 tem a capacidade de infectar várias células residentes, nomeadamente os macrófagos perivascularres, a micróglia e os astrócitos. Estas células infectadas libertam proteínas virais e mediadores inflamatórios do hospedeiro (citocinas e quimiocinas) que, para além de estarem associados à toxicidade neuronal e consequente declínio cognitivo, contribuem também para o aumento da permeabilidade da BHE. Assim, embora o HIV-1 não infete diretamente os neurónios, induz a libertação de fatores solúveis que provocam lesão e morte neuronal, podendo estar associado a uma vasta gama de distúrbios neurológicos, designados no seu conjunto por transtornos neurocognitivos associados ao HIV (HAND). O surgimento de regimes de terapêutica antirretroviral combinada (cART) permitiu diminuir significativamente a taxa de incidência da forma mais grave de HAND, a demência associada ao HIV (HAD); contudo, a elevada prevalência dos transtornos neurocognitivos ligeiros a moderados continua a ser uma preocupação na era atual. Identificar biomarcadores de lesão que possam ser detetados no cérebro antes do surgimento de sintomas neurológicos e desenvolver novas abordagens terapêuticas dirigidas para o SNC constituem estratégias que, a médio prazo, poderão diminuir a prevalência ou até mesmo levar à erradicação dos HAND.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência humana (HIV); Barreira hematoencefálica (BHE); Sistema nervoso central (SNC); Transtornos neurocognitivos associados ao HIV (HAND); Demência associada ao HIV (HAD)

Abstract

The blood-brain barrier (BBB) is a highly selective permeability structure, essential in maintaining the normal function of the central nervous system (CNS). In physiological conditions, BBB protects the neuronal tissue from infectious agents and possible neurotoxins present in the systemic circulation, which presupposes that impairment of its integrity can mediate the pathogenesis of several neurological diseases, including the CNS dysfunction associated with the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). Several mechanisms may underlie HIV-1 neuroinvasion, but its transport mediated by infected monocytes through dysfunctional BBB seems to be the main contributor to the viral reservoir of the brain. Once in CNS, HIV-1 has the ability to infect several resident cells such as perivascular macrophages, microglia and astrocytes. These infected cells release viral proteins and host inflammatory mediators (cytokines and chemokines) which, in addition to being associated with neuronal toxicity and consequent cognitive impairment, also contribute to increase BBB permeability. Thus, although HIV-1 does not directly infect neurons, it induces the release of soluble factors that cause injury and neuronal death, and may be associated with a wide range of neurological disorders, collectively known as HIV associated neurocognitive disorders (HAND). The emergence of combined antiretroviral therapy (cART) regimens allowed a significant reduction in incidence rate of the most severe form of HAND, the HIV-associated dementia (HAD); however, the high prevalence of mild to moderate neurocognitive disorders remains a concern in the current era. Identify injury biomarkers that can be detected in brain before the onset of neurological symptoms and develop new therapeutic approaches directed at the CNS are strategies that may decrease prevalence or even lead to eradication of HAND.

Keywords: Human immunodeficiency virus (HIV); Blood-brain barrier (BBB); Central nervous system (CNS); HIV-associated neurocognitive disorders (HAND); HIV-associated dementia (HAD)

Agradecimentos

Dedico este espaço a todos aqueles que, de alguma forma, deram a sua preciosa contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira, pela orientação, pela disponibilidade manifestada, pela ajuda na definição dos objetivos de estudo, pela cedência e indicação de alguma bibliografia relevante para o tema em análise, pela exigência de método e rigor, pela partilha do seu vasto conhecimento científico, pela revisão crítica do texto, pelos esclarecimentos e sugestões e por todas as palavras de incentivo.

Aos meus pais, Manuel e Helena, por todos os valores transmitidos, pelo apoio incondicional, pela compreensão nos momentos de ausência, pela confiança, pelo constante encorajamento e pela ajuda na superação de todos os obstáculos que foram surgindo nesta caminhada.

À minha irmã Liliana, pelo exemplo de coragem e determinação, pela valorização que sempre depositou no meu trabalho, pelas críticas e sugestões, pela paciência, pelo conhecimento científico e por todo o carinho manifestado.

Às minhas colegas e amigas Inês Fialho, Beatriz Almeida e Beatriz Belém, pelo companheirismo, pela presença e apoio constantes, pela partilha de conhecimentos e pelos momentos inesquecíveis que vivemos ao longo deste percurso.

Por último, e não menos importante, agradeço à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, por ser uma instituição de ensino de excelência, ao pessoal docente e não docente e aos meus colegas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas com quem tive a oportunidade de me cruzar nestes 5 anos, por terem contribuído não só para o meu crescimento profissional, mas também para a aquisição de competências pessoais que serão fundamentais no meu futuro.

Abreviaturas

A β - Péptido β -amilóide

ADMA - Dimetilarginina assimétrica

ANG - Neurogênese adulta

ANI – Comprometimento neurocognitivo assintomático

ApoE - Apolipoproteína E

BHE – Barreira hematoencefálica

BMVECs – Células endoteliais microvasculares cerebrais

Ca²⁺ - Cálcio

CAMs – Moléculas de adesão celular

cART – Terapêutica antirretroviral combinada

CCL – Ligando de quimiocina CC

CX3CL – Ligando de quimiocina CX3C

DCX – Doublecortina

DTI - Imagem de tensor de difusão

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

fMRI - Ressonância magnética funcional

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFAP – Proteína acídica fibrilar glial

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GPCR - Recetores acoplados a proteínas G

GSH – Glutathione

GTPases – Trifosfatases de guanosina

HAD – Demência associada ao HIV

HAND – Transtornos neurocognitivos associados ao HIV

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HIVE – Encefalopatia associada ao HIV

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

IFN – Interferão

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL – Interleucina

ILVs - Vesículas intraluminais

IN – Integrase

IP3 - Inositol 1,4,5-trifosfato

JAM – Molécula de adesão juncional

Kv - Canais de potássio dependentes de voltagem

LRP - Recetor da lipoproteína de baixa densidade

LSP1 – Proteína 1 específica de leucócitos

LTR – Repetição terminal longa

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno.

MCP – Proteína quimioatratora de monócitos

MDM – Macrófagos derivados de monócitos

mGluR - Recetor de glutamato metabotrópico

MIP – Proteína inflamatória de macrófagos

miRNA – Micro RNA

MMPs – Metaloproteinases da matriz

MMP-9 – Metaloproteinase-9 da matriz

MND – Comprometimento neurocognitivo ligeiro associado ao HIV

MRS - Espectroscopia de ressonância magnética

MVBs - Corpos multivesiculares

NFL - Neurofilamento de cadeia leve

NMDAR – Recetor de N-Metil-D-Aspartato

nNOS - Sintetase do óxido nítrico neuronal

NO – Óxido nítrico

NPCs - Células progenitoras neuronais

NVU – Unidade neurovascular

PAF – Fator ativador de plaquetas

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

PKR - Protein Kinase RNA-activated

PLC – Fosfolipase C

PR – Protease

PSD-95 - Proteína 95 de densidade pós-sináptica

RISP - Rev interacting shuttling protein

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RT – Transcriptase reversa

RTK - Recetores de tirosina quinases

sCD₁₄ - CD₁₄ solúvel

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SIV - Vírus da imunodeficiência símia

SNC – Sistema Nervoso Central

SU – Glicoproteína de superfície

TEER – Resistência elétrica transendotelial

TJ – Junções apertadas

TLRs - Toll-like receptors

TM – Glicoproteína transmembranar

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFR – Recetor do fator de necrose tumoral

TRBP - HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular 1

ZO-1 - Zonula occludens 1

(+)ssRNA – RNA de cadeia simples de sentido positivo

Índice:

1	Introdução	13
1.1	Caraterísticas do HIV	13
1.1.1	Classificação e epidemiologia.....	13
1.1.2	Estrutura morfológica do HIV-1	14
1.1.3	Organização do genoma viral	15
1.1.4	Tropismo celular do HIV-1	16
1.2	Estrutura e função da BHE normal	17
1.2.1	Componentes estruturais da BHE: a unidade neurovascular	18
1.2.1.1	BMVECs.....	19
1.2.1.2	Pericitos.....	19
1.2.1.3	Astrócitos	19
1.2.1.4	Micróglia.....	20
2	Mecanismos de neuroinvasão do HIV-1: Passagem através da BHE.....	21
2.1	Infeção pelo HIV-1 e quimiotaxia monocítica através da BHE	23
2.2	Efeito das proteínas virais na função e permeabilidade da BHE	25
2.2.1	Gp120.....	26
2.2.2	Tat	27
2.2.3	Nef.....	28
2.2.4	Vpr	29
3	Compartimentação do HIV-1 no SNC	30
4	Células-alvo na infeção cerebral provocada pelo HIV-1	33
4.1	Desenvolvimento de infeção produtiva em macrófagos e na micróglia	35
4.2	Astrócitos: um espectador passivo na infeção pelo HIV-1?	37
4.2.1	Mecanismo de endocitose do HIV-1 em astrócitos	38
4.2.2	Restrições intracelulares da replicação do HIV-1 em astrócitos	39
5	Lesão do SNC	41
5.1	Mecanismos de dano e perda neuronal causados pelo HIV-1	41
5.1.1	Modelo direto.....	41
5.1.2	Modelo indireto.....	44
5.1.2.1	Efeitos das citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias	45
5.1.2.2	Excitotoxicidade	46
5.1.2.3	Stress oxidativo.....	47
5.1.2.4	Efeitos das proteínas virais	47

5.2	Consequências da neuroinflamação crônica	48
5.2.1	Disrupção sináptica	48
5.2.2	Comprometimento da neurogênese.....	49
5.3	Determinantes genéticos do hospedeiro na neurotoxicidade provocada pelo HIV-1.....	50
5.4	Exossomas: uma via alternativa da neurodegeneração provocada pelo HIV-1.....	51
6	Biomarcadores de lesão do SNC.....	55
6.1	Marcadores moleculares	55
6.2	Técnicas de neuroimagem.....	56
6.2.1	Espectroscopia de ressonância magnética (MRS)	57
6.2.2	Imagem de tensor de difusão (DTI)	57
6.2.3	Ressonância magnética funcional (fMRI)	57
7	Manifestações clínicas do comprometimento neurocognitivo associado ao HIV-1	59
7.1	Demência associada ao HIV (HAD).....	60
7.2	Distúrbios neurocognitivos menores (ANI e MND).....	62
7.3	Neuropatia periférica associada ao HIV	62
8	Conclusões	63
9	Referências Bibliográficas	66

Índice de Figuras:

Figura 1 Estrutura da partícula viral do HIV-1	15
Figura 2 Diagrama esquemático do genoma do HIV-1	16
Figura 3 Representação esquemática da unidade neurovascular (NVU).....	18
Figura 4 Mecanismos de neuroinvasão do HIV-1	22
Figura 5 Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela gp120	43
Figura 6 Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela Tat.....	44
Figura 7 Biogénese dos exossomas.....	52
Figura 8 Papel dos miRNAs na neurotoxicidade provocada pelo HIV-1	54
Figura 9 Frequência dos sintomas de HAD no estadio inicial da doença.....	61

Índice de Tabelas:

Tabela 1 Papel das células-alvo cerebrais do HIV-1 nos HAND..	34
Tabela 2 Critérios de classificação dos HAND	59

1 Introdução

Desde o início da epidemia, mais de 70 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e cerca de 35 milhões morreram devido à infecção provocada por este vírus (1). Atualmente o HIV continua a ser um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial. Estima-se que em 2015 estavam infectadas pelo HIV 36,7 milhões de pessoas, o que corresponde a uma prevalência global de 0,8% (2,3).

Embora o HIV seja mais conhecido pelos seus efeitos devastadores sobre o sistema imunitário e pela síndrome da imunodeficiência humana (SIDA) resultante (4), este vírus pode também alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e penetrar no sistema nervoso central (SNC) por múltiplos mecanismos complexos durante o estadio inicial da infecção (5). A desregulação da BHE durante e após a neuroinvasão é um componente crítico do processo neuropatogénico e resulta da ação combinada de fatores virais e do hospedeiro (6). O comprometimento desta barreira protetora pode, assim, originar vários distúrbios neurológicos, coletivamente designados por transtornos neurocognitivos associados ao HIV (HAND) (4).

Com a introdução da terapêutica antirretroviral combinada (cART) verificou-se uma melhoria da taxa de sobrevivência associada à infecção pelo HIV, no entanto, os HAND continuam a ser uma preocupação constante na era atual, atingindo cerca de metade dos indivíduos infectados (7). A gravidade clínica destes distúrbios neurocognitivos pode variar desde o comprometimento neurocognitivo assintomático (ANI) até à demência associada ao HIV (HAD) e, embora a incidência da forma mais grave de HAND, a HAD, tenha diminuído após a introdução da cART, a prevalência global dos distúrbios neurocognitivos não diminuiu, provavelmente porque os pacientes com formas menos graves de HAND vivem durante mais tempo (6).

1.1 Características do HIV

1.1.1 Classificação e epidemiologia

O HIV foi isolado pela primeira vez em 1983, por Luc Montagnier e Barré-Sinoussi, no Instituto Pasteur em Paris. Trata-se de um vírus de RNA, de cadeia positiva, pertencente à família *Retroviridae* e género *Lentivirus* (8). O género *Lentivirus*

inclui dois tipos de HIV (HIV-1 e HIV-2) que infetam seres humanos e que são responsáveis pelo desenvolvimento da SIDA (9). Embora apresentem muitas semelhanças, incluindo os mecanismos intracelulares de replicação, modos de transmissão e consequências clínicas, existem grandes diferenças entre as infeções causadas por estes dois vírus. A principal diferença clínica é que a progressão para a imunodeficiência ocorre mais lentamente na infeção pelo HIV-2, estando este associado a cargas virais mais baixas. Geograficamente, enquanto o HIV-1 ocorre em todo o mundo, o HIV-2 está principalmente restrito à África Ocidental e comunidades europeias com ligações socioeconómicas a esta região, como Portugal. Esta diferença na epidemiologia está principalmente relacionada com a maior infecciosidade do HIV-1 (10).

1.1.2 Estrutura morfológica do HIV-1

Uma partícula típica de HIV tem um diâmetro de 100-150 nm e apresenta um invólucro lipídico externo penetrado por 72 espículas de uma glicoproteína, a proteína Env. Esta glicoproteína é composta por duas subunidades: uma porção de glicoproteína de superfície (gp120) e uma porção transmembranar (gp41), que estabelece a ligação entre a gp120 e o invólucro lipídico do vírus (8). É na subunidade gp120 que se encontra o local de ligação para o CD4, uma glicoproteína expressa na superfície dos linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e monócitos (11). A superfície interna do invólucro lipídico do vírus é revestida por uma proteína de matriz (p17). No caso do HIV-1, a estrutura viral inclui ainda uma cápside icosaédrica, formada pela proteína p24, dentro da qual está um complexo de proteínas (p7 e p9) e duas moléculas de RNA de cadeia simples de sentido positivo ((+)ssRNA) na forma de uma ribonucleoproteína. Ligadas ao genoma de (+)ssRNA estão várias cópias das enzimas transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR) (8). (Figura 1)

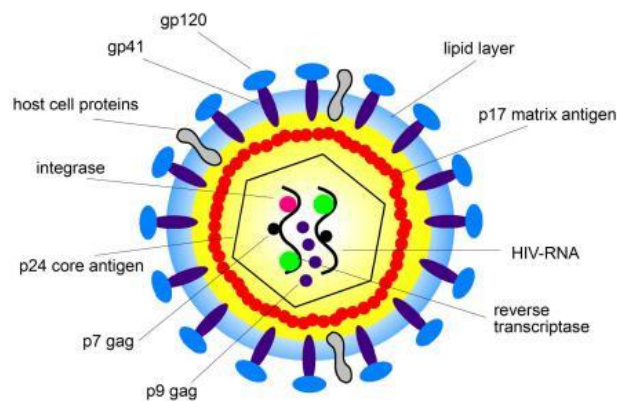


Figura 1 Estrutura da partícula viral do HIV-1. Adaptado de (12).

1.1.3 Organização do genoma viral

O HIV-1 é constituído por um genoma de RNA de aproximadamente 9,7 kilobases (kb). Ambas as extremidades do genoma são flanqueadas por uma região promotora, a repetição terminal longa (LTR). Entre as duas regiões LTR, existem três genes que codificam proteínas estruturais (*gag*, *pol*, *env*), quatro genes que codificam proteínas acessórias (*vpu*, *vif*, *vpr*, *nef*) e dois genes que codificam proteínas reguladoras (*rev*, *tat*). (Figura 2)

O gene *gag* codifica a síntese de uma poliproteína precursora (p55) que, quando clivada pela protease viral, dá origem às proteínas p17, p24, p7 e p6 (13). A proteína p17 (proteína da matriz, MA) localiza-se entre a cápside e o invólucro das partículas virais maduras (8). A proteína p24 (proteína da cápside, CA) forma uma estrutura que envolve o genoma de RNA e as proteínas associadas à cápside viral. As proteínas p7 e p6 (proteínas da nucleocápside, NC) estão diretamente ligadas ao RNA viral, desempenhando um importante papel na sua proteção (13).

O gene *pol* codifica a síntese de uma poliproteína precursora (Gag-Pol), que é um produto de fusão, uma vez que este gene carece de um codão de iniciação. Esta poliproteína é subsequentemente clivada, dando origem à PR, à RT e à IN (14). A PR cliva os precursores Gag e Pol, tornando a partícula viral infecciosa. A RT é um heterodímero assimétrico, que tem como principal função reverter a transcrição do RNA viral em DNA pró-viral antes da sua integração nos cromossomas do hospedeiro. A IN é ativa apenas como um tetrâmero e é responsável pela integração do DNA pró-viral linear de cadeia dupla no cromossoma da célula hospedeira.

O gene *env* codifica a síntese de uma proteína precursora (gp160) que é clivada por proteases celulares, originando a glicoproteína de superfície (SU) gp120 e a glicoproteína transmembranar (TM) gp41 (13). A gp120 é responsável pela ligação aos recetores celulares (CD4 e recetores das quimiocinas) enquanto que a gp41 está também envolvida na entrada viral e mediação da fusão (15).

No que diz respeito às restantes proteínas produzidas pelo HIV-1, as proteínas reguladoras (Tat e Rev) são necessárias para a replicação viral, enquanto que as proteínas acessórias (Nef, Vif, Vpr e Vpu) parecem ser dispensáveis para a proliferação viral em muitos sistemas *in vitro* (12). No entanto, são muitas vezes necessárias para a replicação viral e patogénese *in vivo* e para muitas das funções vitais essenciais durante o ciclo de replicação viral (13).

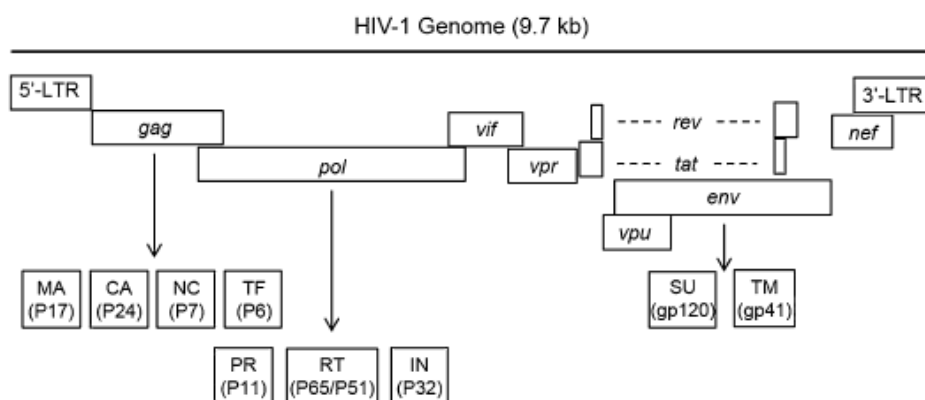


Figura 2 Diagrama esquemático do genoma do HIV-1. Adaptado de (13).

1.1.4 Tropismo celular do HIV-1

Durante o curso da infeção pelo HIV-1, vários tipos celulares no organismo são infetados produtivamente, sobretudo os linfócitos T CD_4^+ e células da linhagem monócito-macrófago (16). As células dendríticas, embora possam ser infetadas pelo HIV-1, não suportam a replicação robusta do vírus. Contudo, desempenham um papel importante na disseminação sistémica do HIV-1 devido à sua localização estratégica nos gânglios linfáticos (17). Os tipos celulares mencionados expressam, em diferentes níveis, a molécula recetora primária, CD4, bem como um ou ambos os co-recetores CCR5 e CXCR4, que são recetores de quimiocinas acoplados a proteínas G transmembranares que atuam como co-recetores essenciais na entrada celular do HIV-1 (16,18). Esta especificidade do complexo recetor é o principal determinante do

tropismo celular do HIV-1 (19). Foi estabelecida uma classificação viral baseada no uso de co-recetor, em que as variantes de HIV-1 monotrópicas para o CCR5 ou para o CXCR4 são denominadas, respetivamente, R5 e X4, e os vírus capazes de usar ambos os co-recetores são chamados R5X4 ou duplamente trópicos. Tanto o CCR5 como o CXCR4 podem ser encontrados em diferentes níveis em células T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas, e os padrões de expressão desses co-recetores contribuem para o tropismo do HIV-1 (18). O tropismo viral é determinado tanto pelo co-recetor utilizado como pelo tipo de célula infetada.

O HIV-1 infeta células-alvo suscetíveis através da interação direta entre a gp120 viral e a molécula recetora CD4 da célula hospedeira, bem como com uma das moléculas co-recetoras (16). O processo de entrada viral na célula hospedeira inicia-se com a ligação da gp120 ao seu recetor celular primário, CD4. A ligação do CD4 resulta numa alteração conformacional que expõe o local de ligação do co-recetor na gp120 (20). O HIV-1 liga-se, assim, ao seu co-recetor – CCR5 ou CXCR4 - após a mudança conformacional induzida pela ligação ao CD4. Este segundo evento de ligação induz uma segunda alteração conformacional na gp120 que expõe o péptido de fusão na proteína viral gp41, que é inserido na membrana celular e medeia a fusão do invólucro viral com a membrana da célula hospedeira. Este processo culmina com a entrada da cápside viral no citoplasma da célula-alvo e consequente replicação do HIV-1, que exige a intervenção não só de proteínas virais, como a RT e a IN, mas também de um grande número de proteínas celulares (16,21).

1.2 Estrutura e função da BHE normal

O requisito essencial para a preservação da atividade cerebral normal é a manutenção de um controlo homeostático estreito e estável do ambiente neural do SNC. Este controlo é conseguido pela existência de uma barreira anatómica e fisiológica única, a BHE, que cria uma interface estritamente regulada entre o SNC e a circulação periférica (5,22). Esta atua como uma barreira protetora, seletivamente permeável, que protege o cérebro não só de substâncias estranhas (como agentes infecciosos e substâncias neurotóxicas) mas também de hormonas e neurotransmissores presentes na circulação sanguínea. Além de proporcionar um ambiente adequado para a rede neural do cérebro, a BHE atua também como um regulador de metabolitos energéticos, canais

iónicos e de transportadores específicos (23). Danos na BHE ou alterações nos sistemas de transporte podem mediar a patogénese de muitas doenças do SNC, incluindo os distúrbios neurológicos associados à infeção pelo HIV-1 (7).

1.2.1 Componentes estruturais da BHE: a unidade neurovascular

A BHE é constituída por uma camada única de células endoteliais especializadas, as células endoteliais microvasculares cerebrais (BMVECs), que se situam entre a corrente sanguínea e a membrana basal, revestindo os capilares cerebrais (6). A membrana basal, composta em grande parte por colagénio tipo IV e laminina, é uma matriz extracelular que ancora as BMVECs aos tecidos subjacentes. Em redor do endotélio e em contacto com a membrana basal encontram-se outros elementos celulares, incluindo pericitos, micróglia e porções terminais de astrócitos, formando um estrato contínuo adicional que separa os vasos sanguíneos do tecido cerebral. Em torno dos vasos sanguíneos verifica-se uma certa distância entre as células endoteliais e o tecido cerebral, formando o espaço de Virchow-Robin, em que se encontram os macrófagos perivascularres executando algumas das funções imunitárias do SNC. O contacto íntimo e a atividade altamente coordenada entre células endoteliais, pericitos, astrócitos, micróglia e neurónios, bem como as interações e sinalização entre eles, formam uma unidade funcional dinâmica, conhecida como unidade neurovascular (NVU), que garante o funcionamento adequado do SNC (22,24). (Figura 3)

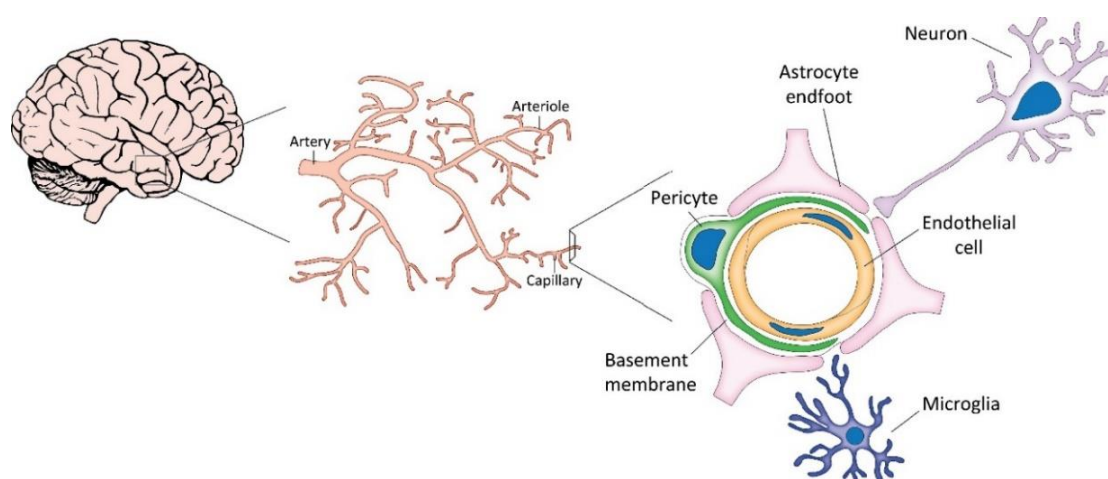


Figura 3 Representação esquemática da unidade neurovascular (NVU).

Adaptado de (25).

1.2.1.1 BMVECs

As BMVECs são células altamente dinâmicas que diferem das restantes células endoteliais do organismo uma vez que formam um endotélio contínuo, sem fenestras, têm junções apertadas (TJs) mais amplas e um escasso transporte vesicular pinocítico (23). O complexo contínuo de TJs entre as células endoteliais adjacentes proporciona uma barreira física que força a maior parte do tráfego molecular a seguir uma via transcelular, que pode ser ativamente regulada através de sistemas de transporte específicos presentes na membrana luminal e abluminal (7). Desta forma, esta camada de BMVECs cria um sistema de permeabilidade seletiva, que inclui tanto mecanismos de captação como transportadores de efluxo (5).

1.2.1.2 Pericitos

Os pericitos desempenham um papel essencial na formação e manutenção da integridade estrutural da BHE, uma vez que envolvem as BMVECs, proporcionando suporte para a função de barreira endotelial (26). Além de possibilitarem a estabilidade mecânica, os pericitos controlam o fluxo sanguíneo cerebral por regulação do diâmetro capilar devido às suas propriedades contrácteis. São ainda responsáveis por libertar fatores de crescimento e moléculas que regulam a permeabilidade microvascular, a remodelação e a angiogénese (22,27,28).

1.2.1.3 Astrócitos

Os astrócitos são células gliais que contribuem para múltiplas regulações dinâmicas no sistema neural. As porções terminais dos astrócitos formam uma rede complexa que cobre mais de 90% da superfície dos microvasos cerebrais e a sua comunicação com os restantes elementos da NVU contribui para várias funções, nomeadamente: modulação da expressão das TJs, indução enzimática, aumento da resistência eléctrica transendotelial (TEER) das BMVECs e a expressão polarizada de transportadores nas membranas endoteliais luminal e abluminal (7,29,30). Os astrócitos estão ainda envolvidos na indução e manutenção da diferenciação das células endoteliais em BMVECs, contribuindo para o fenótipo único destas células e embora não contribuam estruturalmente para a BHE, estão envolvidos na regulação da permeabilidade microvascular (6,27,28).

1.2.1.4 Micróglia

A micróglia corresponde aos macrófagos residentes no SNC e representa cerca de 20% das células gliais presentes no cérebro (31,32). Em condições fisiológicas, a micróglia encontra-se em estado de repouso, que se caracteriza por um fenótipo ramificado, em que processos longos e finos com origem no corpo celular se projetam para o meio circundante. Perante sinais extracelulares, como a presença de agentes patogénicos ou material estranho, a micróglia pode passar do estado de repouso para a forma ativada. Neste processo há perda das longas extensões típicas da microglia em repouso, transformando-se numa forma ameboide que favorece a fagocitose e a mobilidade (33). Para além de ter um papel crucial no reconhecimento e eliminação de patógenos e detritos celulares, a micróglia interage ativamente com as células que constituem a NVU. Esta interação, obtida sobretudo por sinalização parácrina, é fundamental na manutenção da homeostasia do SNC (32).

2 Mecanismos de neuroinvasão do HIV-1: Passagem através da BHE

O comprometimento da integridade da BHE desempenha um papel crucial na patogênese de diversas doenças neurológicas. A neuroinvasão é um evento precoce, ocorrendo mesmo antes da identificação de serologia positiva para o HIV-1 (23,34). Um estudo realizado em indivíduos infectados detetou a presença do vírus no LCR oito dias após a infecção inicial, o que demonstra que a entrada viral no SNC ocorre quase imediatamente após a infecção sistêmica (35). Várias perturbações funcionais da BHE foram identificadas na fase aguda da infecção pelo HIV-1, como demonstrado pela presença de infiltrados celulares e de marcadores séricos no parênquima cerebral, bem como pela imagem de ressonância magnética dinâmica. A nível da estrutura da BHE, foi ainda possível observar a desorganização de TJs, especialmente alterações no padrão de expressão da ocludina e da zonula occludens 1 (ZO-1), duas proteínas essenciais na manutenção da estrutura e normal funcionamento destas junções intercelulares (36).

O HIV-1 não tem a capacidade de entrar no SNC através da transmissão nervosa retrógrada, mas depende da disseminação hematogénica (37). Foram sugeridos diferentes mecanismos para o estabelecimento de infecção no SNC, desde a entrada do vírus livre até a entrada mediada por células e, atualmente, considera-se a existência de três vias distintas para a penetração viral no cérebro: (i) transporte do HIV-1 por leucócitos infectados (hipótese “Cavalo de Tróia”); (ii) passagem de partículas virais livres de células para o cérebro; e (iii) libertação do vírus para o cérebro por células endoteliais infectadas (Figura 4) (4). O verdadeiro mecanismo de infecção envolve, provavelmente, uma combinação das diferentes vias (35).

A hipótese “Cavalo de Tróia”, atualmente conhecida como o principal mecanismo de neuroinvasão do HIV-1, sugere que o vírus penetra no SNC como um passageiro no tráfego de células para o cérebro (23). De acordo com este modelo, a disseminação do HIV-1 é mediada por linfócitos e monócitos sanguíneos que têm acesso aos espaços perivasculares no decorrer da sua vigilância imunitária natural ou porque são atraídos por quimiocinas para os locais de inflamação. Após a neuroinvasão, os monócitos infectados diferenciam-se em macrófagos perivasculares e passam a produzir o vírus dentro do SNC. A replicação viral em macrófagos permite a libertação

de viriões livres e pode facilitar a infecção de células microgliais (38). Considera-se que o tropismo para macrófagos é um pré-requisito para o neurotropismo do HIV-1 (23).

Os restantes mecanismos propostos para a entrada do HIV-1 no SNC, que incluem a infecção direta de células que constituem a BHE e a disseminação viral através das mesmas ou o movimento extracelular direto do vírus livre através da BHE disfuncional, embora sejam importantes, são menos bem caracterizados e possivelmente menores contribuintes para a infecção do SNC (23). No entanto, todos estes processos são reforçados pelo ambiente pró-inflamatório induzido pelo HIV-1, uma vez que a inflamação aumenta a taxa com que o vírus livre e as proteínas virais atravessam a BHE (37).

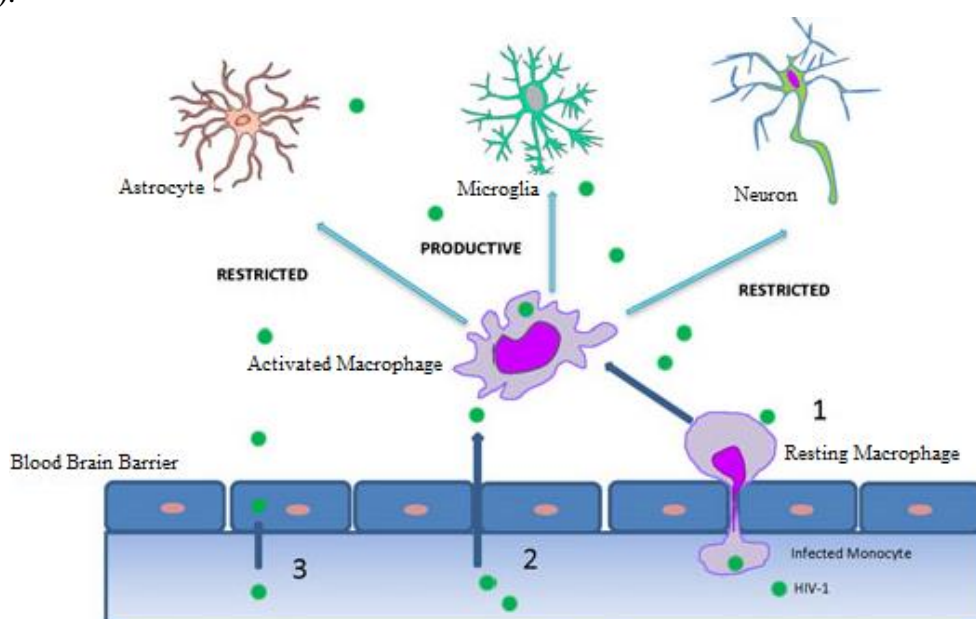


Figura 4 Mecanismos de neuroinvasão do HIV-1. Adaptado de (4). [1] De acordo com a hipótese “Cavalo de Tróia”, a entrada do HIV-1 no SNC ocorre através da migração de monócitos infectados, que posteriormente se diferenciam em macrófagos perivascularres (4). [2] O HIV-1 tem também a capacidade de atravessar a barreira de BMVECs na forma livre, através de junções apertadas disfuncionais, utilizando a via paracelular. [3] Entrada do HIV-1 no SNC por transcitose em vesículas, através de BMVECs (37). Uma vez no cérebro, o vírus infecta produtivamente macrófagos e a microglia.

2.1 Infecção pelo HIV-1 e quimiotaxia monocítica através da BHE

O principal modelo atualmente aceite de infecção do SNC pelo HIV-1 baseia-se nos monócitos infetados presentes no sangue periférico que atravessam a BHE, permitindo a disseminação cerebral do vírus desde o início da infecção. Os monócitos infetados têm maior facilidade em atravessar a BHE do que os monócitos não infetados e, uma vez no SNC, podem repovoar os macrófagos residentes. Em condições normais, não patológicas, este processo é rigorosamente regulado, no entanto, a taxa de repovoação de macrófagos pode aumentar significativamente em condições inflamatórias. Para além disso, a regulação do processo é perdida assim que se verifique a interrupção da integridade da BHE (6).

Estudos recentes centraram-se em determinar se um subconjunto de monócitos é particularmente importante na entrada do HIV-1 no SNC ou na amplificação do processo inflamatório local (38). Os monócitos do sangue periférico podem ser divididos em dois subconjuntos, com base na expressão de CD14 e CD16. Em indivíduos saudáveis, os monócitos que expressam apenas o CD14 ($CD14^{hi}/CD16^{-}$) são os mais prevalentes, enquanto que os monócitos ativados, não clássicos, que expressam elevados níveis de CD16 e níveis mais baixos de CD14 ($CD14^{low}/CD16^{+}$) correspondem a cerca de 5-15% da população de monócitos circulantes. No entanto, o subconjunto de monócitos $CD14^{low}/CD16^{+}$ é maior em indivíduos infetados pelo HIV-1, podendo expandir-se para 40% da população de monócitos presente no sangue periférico de pacientes com SIDA (6,17). O aumento dos monócitos $CD14^{low}/CD16^{+}$ circulantes tem sido associado especificamente ao desenvolvimento de HAND e, embora não seja totalmente entendido por que motivo isso ocorre, pensa-se que esta população monocítica migra mais eficazmente para o SNC do que o subconjunto $CD14^{hi}/CD16^{-}$ normalmente predominante (6). Portanto, a expansão dos monócitos $CD14^{low}/CD16^{+}$ é preditiva de progressão rápida da doença e, provavelmente, envolvimento do SNC (39). Para além disso, estes monócitos são mais suscetíveis à infecção pelo HIV-1 e estabelecimento de infecção produtiva (40). O facto de suportarem níveis mais elevados de replicação viral pode estar diretamente relacionado com o aumento da secreção de citocinas com efeito autócrino que regulam positivamente fatores de transcrição que se ligam e ativam a LTR do HIV-1 (41).

Para se difundirem através da BHE, as células imunitárias utilizam mecanismos de diapedese paracelular e transcelular, e considera-se que é a regulação destes dois processos que determina a disseminação do HIV-1 para o SNC. A regulação da diapedese paracelular resulta da interação entre moléculas presentes na superfície de leucócitos e das BMVECs e é melhorada através da ativação recíproca dessas populações celulares que regulam positivamente as moléculas de superfície (41,42). A difusão através da BHE é mediada pela ativação de vias intracelulares das BMVECs, que transitoriamente aumentam a expressão superficial de moléculas de adesão celular (CAMs) (43). Esta ativação de BMVECs pode ser o resultado da ligação de leucócitos ativados ou a resposta a citocinas ativadoras secretadas por leucócitos, incluindo a interleucina (IL)-17, o fator de necrose tumoral (TNF)- α , o interferão (IFN)- γ , a IL-22 e a IL-1 β (44). Deste modo, a extensão da diapedese é fortemente influenciada pelo estado de ativação tanto de leucócitos como de BMVECs e considera-se que a desregulação da integridade das TJs é um fator adicional que afeta a eficiência deste processo (45). A CAM-1 intercelular (ICAM-1) foi identificada como sendo fundamental para mediar as alterações das TJs durante o extravasamento de linfócitos para o SNC e considera-se que as CAMs individuais desempenham diferentes papéis na regulação da diapedese de populações leucocitárias específicas. A migração de monócitos para o SNC parece ser facilitada pela intervenção da CAM-1 vascular (VCAM-1) e da CAM-1 endotelial plaquetária (PECAM-1) (46).

A ativação da BHE também pode ser realizada através da estimulação de BMVECs por citocinas ou outros fatores não provenientes de leucócitos. Neste caso, as BMVECs ativadas podem, por sua vez, ativar leucócitos circulantes através de quimiocinas reguladas positivamente na sua superfície e que interagem com recetores presentes nos leucócitos (47). Por exemplo, os níveis de expressão de CXCL12 em BMVECs e do seu recetor CXCR4 em leucócitos circulantes favorecem a ativação de células infiltrantes, aumentando a sua capacidade para atravessar a BHE (48). Esta evidência assume um papel particularmente importante no caso da infeção provocada pelo HIV-1, dada a relevância do CXCR4 como co-recetor na entrada viral. Assim, alterações nos níveis de CXCR4 podem influenciar o estado de ativação da BHE bem como a regulação da diapedese (6).

O estabelecimento de inflamação perivascular induz a secreção de citocinas e quimiocinas que amplificam a reação inflamatória, atraindo outros monócitos

circulantes e linfócitos T CD4⁺ infetados que também podem contribuir para o aumento da carga viral no SNC (38). Associadas ao aumento da permeabilidade da BHE foram identificadas as citocinas IL-1 e TNF- α e quimiocinas tais como a CCL3, CCL4, CCL5, MCP-1 e CX3CL1 (6,34). O TNF- α , para além de ser conhecido por aumentar a permeabilidade da BHE às células infetadas pelo HIV-1, também induz a expressão de moléculas de adesão celular e regula positivamente a MCP-1, a principal quimiocina relacionada com a infeção do SNC provocada pelo HIV (4). A MCP-1 está presente em concentrações facilmente mensuráveis no LCR e está associada ao desenvolvimento de HAD (38). Na verdade, um aumento do risco de HAD foi recentemente relacionado com um alelo mutante da MPC-1 que causa maior infiltração de fagócitos mononucleares nos tecidos (49).

A secreção destes mediadores pró-inflamatórios, bem como de produtos virais tóxicos pelas células imunitárias infetadas pelo HIV-1 levam à degradação de proteínas das TJs, ao stress oxidativo e à regulação positiva de CAMs. Isto resulta na criação de um gradiente de quimiotaxia através da BHE, que aumenta o recrutamento de células provenientes do compartimento periférico para o SNC (17).

Curiosamente, existem algumas hipóteses que defendem que o aumento do tráfego de monócitos para o SNC associado ao desenvolvimento de HAND é uma consequência da alteração precoce da mucosa gastrointestinal observada durante a infeção pelo HIV-1 (36). O que se verifica é que o comprometimento da integridade estrutural do trato intestinal pode causar translocação microbiana para a corrente sanguínea, que resulta em níveis plasmáticos elevados de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. O aumento da concentração plasmática de LPS pode induzir uma ativação imunitária sistémica generalizada, levando ao aumento do risco de transição de monócitos infetados pelo HIV-1 para os órgãos finais, incluindo o SNC. Vários estudos têm demonstrado que níveis elevados de LPS em pacientes infetados pelo HIV-1 estão associados ao aumento da ativação monocítica e desenvolvimento de HAD (4).

2.2 Efeito das proteínas virais na função e permeabilidade da BHE

No decurso da infeção pelo HIV-1, as alterações na permeabilidade e a ativação da BHE resultam da ação conjunta de eventos intra e intercelulares que envolvem vários tipos de células, bem como proteínas virais e fatores do hospedeiro. Quando uma célula

desenvolve infecção ativa provocada pelo HIV-1, além de expressar um perfil alterado de citocinas, apresenta também a capacidade de produzir viriões e de secretar proteínas virais (6). Estudos realizados demonstraram que a presença de viriões na BHE não é necessariamente suficiente para estabelecer a sua ativação, contudo, células mononucleares infetadas com o vírus foram efetivas em induzir essa ativação (50). Este facto sugere que elementos segregados pelas células infetadas são necessários no estabelecimento das alterações de permeabilidade da BHE durante a infecção pelo HIV-1 (51), evidenciando a importância de algumas proteínas virais, nomeadamente a gp120, a Tat, a Nef e a Vpr, que atuam como mediadores necessários no comprometimento da integridade da BHE (23).

2.2.1 Gp120

A gp120 do HIV-1 está presente na superfície do invólucro viral e desempenha um papel importante na entrada do vírus nas células hospedeiras, através da ligação que estabelece não só com o recetor CD4 mas também com os co-recetores CCR5 e CXCR4. Quando uma célula infetada é danificada, a proteína gp120 é libertada na circulação sanguínea e pode ser detetada no soro de pacientes infetados (6). Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que esta proteína atua como uma potente neurotoxina, atravessando a BHE por um mecanismo de endocitose adsorptiva. Uma vez no cérebro, a gp120 tem uma ação neurotóxica direta sobre os neurónios e induz ainda efeitos indiretos como o aumento da produção de citocinas inflamatórias, o aumento do stress oxidativo e consequente comprometimento funcional da BHE (7).

De forma a analisar o impacto da gp120 circulante na função da BHE foi utilizado um modelo *in vivo* de ratinhos transgénicos que expressam e secretam esta proteína. Os resultados obtidos confirmaram um aumento da permeabilidade da camada de células endoteliais expostas ao soro contendo a gp120, verificando-se o restauro completo da permeabilidade quando o soro foi tratado com um anticorpo monoclonal específico da gp120. Estes dados evidenciam, assim, que a presença desta proteína viral no soro é determinante para induzir o aumento da permeabilidade da BHE observado (6,23). A análise de amostras de cérebro de ratinhos transgénicos para a gp120 permitiu verificar que os níveis de expressão de ICAM-1 e de VCAM-1, duas moléculas de adesão expressas na superfície de células endoteliais ativadas, estavam significativamente aumentados quando comparados com os níveis obtidos em amostras de cérebro de

ratinhos não transgênicos para esta proteína viral. Dado que estas moléculas estão envolvidas no recrutamento e migração transendotelial de linfócitos e monócitos, os resultados obtidos evidenciam o papel da gp120 na ativação e lesão funcional da BHE (6,7,17).

Além dos estudos enunciados anteriormente, experiências *in vitro* utilizando culturas de BMVECs humanas expostas à gp120 mostraram uma diminuição dos níveis das proteínas ZO-1, ZO-2 e ocludina, com consequente perturbação funcional das TJs. Os níveis diminuídos de ZO-1 e ZO-2 estão associados ao direcionamento destas proteínas para a via de degradação proteossomal, retratando um novo mecanismo molecular de comprometimento da BHE provocado pela gp120 (52). Embora os níveis proteicos de claudina-1 e claudina-5 não sejam afetados por esta proteína viral, a perda de conexão com o citoesqueleto devido à perda de ZO-1 pareceu ser suficiente para diminuir significativamente a função das TJs, resultando no aumento da permeabilidade e na redução da TEER (53). Contudo, após o término da exposição da monocamada de BMVECs à gp120, verificou-se o restabelecimento dos níveis basais de permeabilidade e de TEER, o que sugere que a BHE pode recuperar a sua função se os níveis séricos de gp120 se mantiverem controlados (54).

Tanto as BMVECs como as TJs da BHE são altamente sensíveis às alterações do equilíbrio redox e, como medida de proteção, expressam altos níveis de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase, a glutathiona redutase e a catalase. Contudo, a análise de BMVECs após exposição à gp120 revelou uma diminuição dos níveis destas enzimas, bem como de glutathiona reduzida (55). Estes dados confirmam que a gp120 induz a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e dano oxidativo, o que contribui para o comprometimento da integridade da BHE (56). Estas alterações aumentam o tráfego de células infetadas pelo HIV-1 e de fatores tóxicos para o SNC, promovendo a patogénese das formas mais graves de HAND (53).

2.2.2 Tat

A Tat é uma proteína viral reguladora envolvida nos processos de transcrição e replicação do HIV-1 (57). É produzida e libertada por células infetadas pelo vírus e pode ser detetada tanto no soro como no LCR de indivíduos infetados pelo HIV-1 (7). Tal como ocorre com a gp120, considera-se que a endocitose adsorptiva é o mecanismo mais provável de passagem da Tat através da BHE (23).

O efeito nocivo da Tat no normal funcionamento da BHE foi observado tanto em modelos celulares *in vitro* como *in vivo* (36). A análise de BMVECs humanas expostas a esta proteína viral revelou a perda da integridade das TJs, com diminuição da expressão de ZO-1, ZO-2, ocludina e claudina-5. Os efeitos da Tat na expressão de proteínas TJs e na função de barreira são mediados por múltiplas vias de sinalização (58–60).

Para além de perturbar o normal funcionamento das TJs, a Tat tem também a capacidade de interagir com os astrócitos que fazem parte da NVU. A análise de uma cultura de astrócitos tratados com esta proteína viral evidenciou a diminuição da neutralização do TNF- α , cuja acumulação resultou na regulação positiva dos níveis de metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9). Quando ativa, a MMP-9 degrada a laminina e o colagénio tipo IV, dois componentes essenciais da BHE, e contribui também para a degradação da ocludina (58,61). Esta descoberta é particularmente importante tendo em conta a expressão constitutiva de TNF- α previamente discutida.

2.2.3 Nef

A Nef, uma proteína acessória do HIV-1, é dispensável para a replicação viral em culturas celulares, mas promove a replicação e a patogénese do vírus no hospedeiro infetado. Para além de interferir na transdução de sinal por ligação a proteínas quinases celulares, a Nef tem também a capacidade de induzir a atividade da MMP-9 (62). Estudos efetuados *in vivo*, utilizando modelos animais, e experiências *in vitro*, utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e a linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7, comprovaram o aumento da expressão da MMP-9 associado à exposição à Nef, identificando-se assim um mecanismo provável através do qual esta proteína pode estar associada ao desenvolvimento de perturbações na BHE (23). Os resultados obtidos demonstraram também uma regulação positiva de genes pró-apoptóticos, como a caspase-6, -8, -9 e -10, do recetor do TNF-12 (TNFR-12), das proteínas tumorais P53 e P73, da proteína 6 associada à morte (DAXX) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) 7. Estes dados sugerem que a Nef induz a apoptose de BMVECs humanas, o que constitui uma via alternativa da contribuição desta proteína viral na patogénese da SIDA (23,63).

2.2.4 Vpr

A Vpr é uma proteína acessória incorporada na cápside do HIV-1, que pode atuar como uma proteína extracelular e como uma proteína viral intracelular expressa em células infectadas. É cada vez mais evidente que a Vpr desempenha um papel único no estabelecimento de infecção no SNC associada ao HIV-1, participando em diversos mecanismos que contribuem para a neuropatogênese viral. A expressão desta proteína resulta em citotoxicidade em vários tipos de células, bem como em alterações nos processos metabólicos e nas vias de sinalização (64). Experiências *in vitro* em astrócitos demonstraram que a presença da Vpr extracelular afeta a via glicolítica, devido aos danos que causa na atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Este efeito nocivo da Vpr provoca uma redução dos níveis de ATP intracelulares, levando à acumulação de ROS e à redução da concentração de glutathione (GSH). Além disso, estudos efetuados em astrócitos primários de feto humano expostos à Vpr extracelular comprovaram o efeito desta proteína viral no aumento da permeabilidade da BHE e no recrutamento de células da linhagem monócito-macrófago para o SNC através da desregulação do compartimento de astrócitos. Observou-se ainda um aumento significativo na libertação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e -8), na secreção de quimioatratores, na ativação da caspase-3 e -7 e nos níveis de MCP-1 em resposta à Vpr extracelular (23,65).

3 Compartimentação do HIV-1 no SNC

O SNC tem sido considerado um compartimento imunologicamente privilegiado que atua como um importante reservatório para o HIV-1 (66). Os compartimentos são definidos como locais anatômicos que restringem o fluxo genético do HIV, permitindo a evolução viral e a divergência a partir do vírus que circula no sangue periférico. Por outro lado, os reservatórios são células ou regiões anatômicas onde o HIV ou células infectadas pelo vírus sobrevivem porque a cinética viral é mais lenta do que a do sangue periférico. Tanto os compartimentos como os reservatórios protegem o HIV de respostas imunitárias específicas, da terapêutica antirretroviral e de alterações bioquímicas, proporcionando assim um ambiente propício para a ocorrência de interações patógeno-hospedeiro (67).

Diferentes estudos efetuados durante a infecção aguda pelo HIV-1 mostraram que o vírus está presente no LCR em estádios iniciais da infecção, inclusive em alguns pacientes com infecção primária (38). Contudo, embora o HIV-1 tenha acesso precoce ao cérebro, não está claro se um único evento de entrada permite a disseminação do vírus e a sua replicação independente no SNC, ou se existem múltiplos pontos de entrada durante o curso da infecção (35). É provável que diferentes mecanismos ocorram, dependendo do hospedeiro, da via de infecção e possivelmente das características dos isolados virais que infectam diferentes indivíduos. No entanto, embora os detalhes possam variar, a infecção a longo prazo pelo HIV-1 leva ao surgimento de populações virais geneticamente isoladas no tecido neural (38). A infecção localizada no SNC e as alterações genéticas encontradas nas estirpes de HIV-1 presentes no LCR e no tecido cerebral são denominadas "compartimentação no SNC" do HIV-1 (35). Vários fatores, como as características imunitárias específicas do SNC, a BHE, a rápida mutação e recombinação do HIV-1 e a dificuldade de penetração de fármacos antirretrovirais através da BHE contribuem para a compartimentação viral no SNC, criando assim um reservatório que permite a replicação do HIV-1 independentemente da periferia (68).

O principal impedimento para analisar a evolução viral no SNC consiste na impossibilidade de obtenção de amostras diretas do HIV-1 presente no tecido cerebral em diferentes momentos da vida do paciente infectado (69). No entanto, o estudo das populações de HIV-1 presentes em amostras de sangue e LCR emparelhadas permitiu

investigar a dinâmica da infecção pelo vírus no SNC em vários estádios da doença. Dado que o LCR é um compartimento intermediário entre o cérebro e a periferia, as populações virais no LCR estão geneticamente relacionadas com as de ambos os compartimentos. Estudos de amostras de sangue e LCR emparelhadas, obtidas a partir de indivíduos infectados pelo HIV-1, demonstraram que populações virais semelhantes foram detetadas em ambos os compartimentos dentro de um mês após o início da infecção aguda. Estudos cinéticos sugeriram que o tráfego de células T CD₄⁺ de curta duração entre o sangue periférico e o SNC desempenha um papel importante na disseminação das populações de HIV-1 para o SNC durante a fase assintomática. Em contraste, a análise de amostras de sangue e LCR emparelhadas em fases mais avançadas da doença demonstrou a existência de variantes genéticas únicas do HIV-1 no LCR em comparação com o sangue periférico do mesmo indivíduo, o que implica a presença de estirpes virais que evoluíram de forma independente dentro do compartimento do SNC (34). Outro estudo, que teve como propósito investigar a compartimentação do gene *env* do HIV-1 entre o LCR e o plasma sanguíneo em todos os estádios do curso da doença, demonstrou que a compartimentação foi apenas encontrada em pacientes cronicamente infectados com disfunção neurológica e em pacientes com HAD (70). Estas descobertas sugerem que as estirpes virais adaptadas para estabelecer replicação no SNC desempenham um papel importante no início do dano neuronal. Alternativamente, o comprometimento neurocognitivo pode estar associado a uma imunossupressão mais acentuada, permitindo a evolução de estirpes virais de forma independente dentro do SNC (34).

A compartimentação genética de estirpes virais no SNC sugere que a evolução adaptativa pode ocorrer em resposta a restrições únicas no microambiente do SNC, tais como a presença de diferentes populações de células-alvo e a existência de pressões de seleção imunitária (34,71). Os vírus primários obtidos a partir de pacientes dementes e não dementes são geneticamente e biologicamente distintos, o que suporta a hipótese de que variantes virais específicas podem desempenhar um papel determinante no desenvolvimento de infecção no SNC e no estabelecimento de HAD (34).

Embora a introdução da terapêutica antirretroviral permita uma supressão efetiva da viremia, o HIV-1 pode continuar a replicar-se no SNC e favorecer o desenvolvimento de estirpes resistentes em pacientes com manifestações neurológicas (67). A taxa de diminuição da carga viral no LCR pode variar de acordo com o estágio

da doença, verificando-se frequentemente uma diminuição mais lenta em pacientes com HAD. Estes resultados sugerem que a principal fonte celular do HIV-1 no LCR varia ao longo do curso da doença, o que reflete a adaptação genética e a replicação de um subgrupo de populações de HIV-1 em células de vida longa presentes no SNC (70). A determinação da carga viral no LCR é importante para avaliar a compartimentação do HIV-1 no SNC e para monitorizar os efeitos terapêuticos, considerando-se que uma carga viral superior a 200 cópias/mL no LCR e inferior a 50 cópias/mL no plasma, no mesmo paciente, é consistente com a ocorrência de compartimentação viral no SNC (67).

4 Células-alvo na infecção cerebral provocada pelo HIV-1

O HIV-1, classificado como um vírus neuroinvasivo e neuropatogénico, está envolvido no comprometimento da função neurocognitiva através de múltiplos mecanismos que envolvem a infecção de células residentes no SNC. Tendo em conta a incidência das manifestações de HAD no início da epidemia da SIDA e as elevadas taxas de sintomas neurológicos encontradas antes da era da cART, parece evidente o papel do HIV-1 no estabelecimento de lesões no SNC (37).

Embora o HIV-1 presente na periferia atinja principalmente linfócitos T CD₄⁺ e células da linhagem monócito-macrófago, tem efeitos distintos nessas populações celulares (72). A infecção pelo HIV-1 resulta na lise de linfócitos T CD₄⁺ e leva à sua depleção, sendo esta uma característica da patogénese viral. Pelo contrário, as células monocíticas são menos suscetíveis ao efeito citopático do vírus. Dado que o tempo de vida de um macrófago infetado pelo HIV-1 é longo, estas células atuam como reservatórios da produção viral por um longo período de tempo em pacientes infetados. Além disso, os macrófagos estão praticamente presentes em todos os tecidos, o que facilita a disseminação do HIV-1 no organismo de pessoas infetadas e permite que o vírus atinja locais como o cérebro (73). Os macrófagos são, assim, suspeitos de serem importantes atores na disseminação do HIV-1 (72).

Tendo em conta que as células da linhagem monócito-macrófago servem como reservatórios virais e que, devido à sua natureza migratória, têm a capacidade de atravessar a BHE, estas podem contribuir para a neuropatogénese associada ao HIV-1 (16). Uma vez no SNC, os principais alvos celulares do HIV-1 são os macrófagos residentes, os astrócitos e os neurónios, sendo que o tipo de infecção desenvolvido está diretamente relacionado com a célula-alvo cerebral infetada (Tabela 1). Os macrófagos residentes são considerados essenciais no processo neurodegenerativo, dado que são células resistentes aos efeitos citopáticos do HIV-1 e, por isso, podem sustentar a infecção viral por um longo período de tempo. No SNC estão presentes quatro tipos principais de macrófagos: macrófagos meníngeos, macrófagos do plexo coróide, macrófagos perivasculares e micróglia. No entanto, apenas os macrófagos perivasculares e a micróglia parecem ter um papel essencial no dano neurológico (71).

Embora estas células sejam abundantes no SNC, provavelmente expressam densidades de CD4 muito baixas para facilitar a entrada eficiente ou para permitir a replicação da maioria dos isolados de HIV-1. No entanto, verifica-se que num estadio avançado da doença, o SNC de alguns indivíduos contém linhagens de HIV-1 que evoluíram a capacidade de entrar em células que expressam baixos níveis de CD4 e estão bem adaptadas para infetar macrófagos. Estes vírus macrófago-trópicos (M-trópicos) são capazes de manter a replicação no SNC por muitas gerações e a sua presença está associada a um comprometimento neurocognitivo severo (21). Os astrócitos, por sua vez, embora sejam células abundantes no cérebro humano, não expressam o recetor CD4 na sua superfície. Assim, a infeção pelo HIV-1 nestas células é realizada por uma via alternativa, independente da utilização do complexo recetor/co-recetor (74).

Tabela 1 Papel das células-alvo cerebrais do HIV-1 nos HAND. Adaptado de (71).

Tipo celular	Tipo de infeção	Efeitos nocivos no cérebro
Macrófagos perivasculares	Produtiva	<ul style="list-style-type: none"> - Indução da libertação de proteínas virais (gp120, Tat, Vpr); - Indução da produção de neurotoxinas; - Ativação da replicação viral.
Micróglia	Produtiva	<ul style="list-style-type: none"> - Indução da libertação de proteínas virais (gp120, Tat, Vpr); - Indução da produção de neurotoxinas; - Ativação da replicação viral.
Astrócitos	Restrita	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da permeabilidade da BHE; - Indução da migração de monócitos para o cérebro; - Aumento da libertação de Ca^{2+} e de glutamato; - Diminuição da absorção de glutamato;

		- Aumento da produção de neurotoxinas.
Neurónios	Restrita	- Aumento da libertação de Ca^{2+} intracelular; - Aumento da ativação das caspases; - Aumento da expressão da p53.

4.1 Desenvolvimento de infeção produtiva em macrófagos e na micróglia

A replicação do HIV-1 e o estabelecimento de infeção no SNC são processos tipicamente limitados pela disponibilidade de células-alvo. Os macrófagos perivasculares e a micróglia residente são, atualmente, considerados os principais reservatórios celulares do HIV-1 no SNC, contribuindo para o desenvolvimento de infeção produtiva neste compartimento (34). Embora anteriormente tenha sido sugerido que, devido à sua rápida substituição, os macrófagos perivasculares não poderiam contribuir para a persistência do HIV-1 no SNC, descobertas mais recentes propõem que esta população celular pode alojar o vírus por um longo período de tempo (38). A micróglia, por sua vez, é substituída com pouca frequência, apresentando uma vida útil mais longa de pelo menos vários meses (75).

O estabelecimento de infeção produtiva em macrófagos e na micróglia requer a entrada do HIV-1 na célula, a qual envolve a interação direta da gp120 viral com o CD4 e um co-recetor (16). Embora o CCR5 seja o principal co-recetor utilizado pela maioria dos isolados de HIV-1 encontrados no cérebro, a sua utilização não é necessária nem suficiente para determinar o neurotropismo viral (76). Na verdade, o co-recetor CXCR4 também é expresso em macrófagos e na micróglia e pode estar envolvido na entrada eficiente de vírus X4 e R5X4 (77). Tendo em conta que a análise de isolados virais obtidos a partir de amostras cerebrais de indivíduos infetados pelo HIV-1 comprovou a utilização do CCR5, CXCR4 ou de ambos os co-recetores no estabelecimento de infeção nas células-alvo (78), foi proposto que o tropismo viral para macrófagos e para a micróglia é restrito ao nível da entrada por um mecanismo independente da especificidade do co-recetor, assumindo-se que outras características do Env podem

estar associadas ao neurotropismo do HIV-1. Estas descobertas sugerem, assim, que é o tropismo para macrófagos, e não a utilização do CCR5 como co-recetor, que determina o neurotropismo viral (34).

Os macrófagos e a micróglia residentes no SNC expressam densidades de CD4 e CCR5 na superfície celular muito inferiores às expressas pelas células-alvo CD4⁺ presentes no sangue periférico (79). Tal facto pode restringir a infeção do SNC por estirpes específicas de HIV-1. Deste modo, os mecanismos que reduzem a dependência do Env relativamente aos níveis de CD4 e CCR5, como o aumento da afinidade do Env para o complexo recetor, o aumento da exposição do local de ligação do co-recetor, o aumento da capacidade de fusão e as mudanças estruturais que facilitam os rearranjos conformacionais que ocorrem após a ligação do CD4 e/ou co-recetor podem contribuir para o aumento do neurotropismo do HIV-1 (34).

Alguns estudos efetuados demonstraram a existência de estirpes de HIV-1 com um tropismo aumentado para células que expressam baixos níveis de CD4 e CCR5 (80,81). Por exemplo, o isolado BORI-15, uma variante do HIV com dependência diminuída relativamente aos níveis de CD4, apresenta uma elevada capacidade de fusão e induz a formação de células gigantes multinucleadas (um marcador patológico do HIV no SNC) em culturas de micróglia e de macrófagos derivados de monócitos (MDM). Os determinantes da redução da dependência de CD4 foram associados principalmente às regiões de loop variável V1V2 da gp120, no entanto, determinantes adicionais nas regiões V3 e V4 e na gp41 também podem contribuir para a redução da dependência ou até mesmo independência de CD4 (82,83). A redução da dependência dos níveis de CD4 e/ou CCR5 pode ser um meio através do qual as estirpes de HIV-1 adquirem um aumento do neurotropismo e da neurovirulência. Parece ainda evidente que as variantes de HIV-1 com dependência reduzida do complexo recetor apresentam uma maior afinidade para o CD4 e/ou CCR5, representando um fenótipo viral patogénico que contribui para o aumento dos níveis virais no SNC e para as manifestações neurodegenerativas da SIDA (34).

As estirpes de HIV-1 com dependência reduzida relativamente ao CD4/CCR5 podem evoluir no SNC de um indivíduo infetado como consequência da adaptação para o crescimento em macrófagos perivasculares e na micróglia (34). Dados obtidos a partir de um estudo sugerem que vários genótipos virais penetram no cérebro, mas apenas um subconjunto limitado de vírus macrófago-trópicos se replica no SNC de indivíduos

infetados. Para além disso, foi também sugerido que a seleção de vírus macrófago-trópicos não ocorre ao nível da BHE, mas sim após a entrada viral no SNC, sendo que os macrófagos/células microgliais desempenham um papel fundamental no processo de seleção (84).

4.2 Astrócitos: um espectador passivo na infeção pelo HIV-1?

Os astrócitos, as células gliais mais abundantes no cérebro humano, estão envolvidos na plasticidade cerebral e na neuroproteção, apresentado um papel fundamental na manutenção da homeostase (74,85). Na presença de lesões cerebrais ou em resposta a infeções virais, como a provocada pelo HIV-1, os astrócitos são ativados para o seu estado reativo. Investigações moleculares efetuadas em culturas celulares e em tecidos cerebrais infetados pelo HIV-1 demonstraram a presença de DNA viral em 3-19% dos astrócitos, no entanto, a ausência de RNA viral e de expressão proteica permitiram afirmar que estas células gliais não desenvolvem infeção produtiva (74). Para além disso, a deteção de DNA de HIV-1 em astrócitos não garante que este esteja no estado integrado, uma condição crítica para a ocorrência de replicação viral (85). Vários fatores intracelulares do hospedeiro foram implicados no estabelecimento de infeção latente/não produtiva, contudo, estudos efetuados identificaram que é a entrada viral ineficiente, que ocorre devido à ausência do recetor de superfície CD4, o principal fator que impossibilita o desenvolvimento de infeção produtiva pelo HIV-1 em astrócitos (86). Em estudos de monitorização da cinética viral observou-se, inclusivamente, a adsorção transitória de partículas virais à superfície destas células através da fusão incompleta da membrana plasmática. Essas partículas de HIV-1 incompletamente fundidas com a membrana dos astrócitos foram libertadas para o meio extracelular dentro de 10 dias após a infeção sem terem entrado realmente dentro das células (74). Estes dados vêm corroborar a ideia de que a infeção pelo HIV-1 em astrócitos é prejudicada ao nível da entrada viral (87).

Considera-se, atualmente, que a entrada natural do HIV-1 em astrócitos ocorre por endocitose e é dependente do pH (88). No entanto, o processo endocítico pressupõe a perda da viabilidade viral, dado que a maioria das partículas virais são degradadas nos endossomas e apenas algumas que escapam intactas permitem o estabelecimento de infeção bem sucedida. Assim, a entrada do HIV-1 em astrócitos leva ao

desenvolvimento de infecção restrita e, embora estas células possam não contribuir para a carga viral global do cérebro, servem como reservatórios virais a longo prazo (85).

4.2.1 Mecanismo de endocitose do HIV-1 em astrócitos

A endocitose é um processo celular complexo, no qual as partículas virais penetram no meio intracelular através da via endocítica, envolvendo endossomas precoces, tardios e de reciclagem, e cuja função depende da atividade de várias proteínas associadas (85,89). O normal funcionamento do endossoma envolve as proteínas Rab (proteínas relacionadas com o Ras presentes no cérebro), que são trifosfatases de guanosina (GTPases) pertencentes à superfamília Ras. Estas proteínas estão envolvidas na regulação de etapas específicas das vesículas endocitadas a partir da membrana plasmática para os endossomas precoces (Rabs 4 e 5), endossomas tardios e lisossomas (Rab 7) e endossomas de reciclagem de vesículas (Rabs 4 e 11), atuando como importantes fatores na distinção entre vias que levam a localizações intracelulares distintas (90–94). Várias investigações demonstraram que a infecção pelo HIV-1 em astrócitos mediada por endocitose envolve endossomas precoces, tardios e de reciclagem e que a supressão das proteínas Rab-5, -7 e -11 com a utilização de RNA de interferência (RNAi) comprometeu o estabelecimento de infecção nestas células, comprovando o papel indispensável das proteínas Rab no processo de endocitose viral (88). Demonstrou-se também que a proteína 1 específica de leucócitos (LSP1) desempenha um papel crucial no processo endocítico, uma vez que direciona as partículas de HIV-1 para endossomas e proteossomas, facilitando a degradação viral (95,96). A sua depleção através da utilização de RNAi está associada à diminuição da taxa de endocitose em astrócitos (88).

A ideia de que a entrada do HIV-1 em astrócitos é efetuada por endocitose e dependente do pH, e que a maquinaria interna endossomal está envolvida na degradação das partículas virais, surgiu quando o tratamento com fármacos lisossomatrópicos (cloroquina e bafilomicina A) resultou no aumento da infecção viral nestas células (87,97). Estes fármacos atuam através do estabelecimento de mudanças na função endossomal, uma vez que estão envolvidos no aumento do pH lisossômico e na inibição da fusão endolisossômica, diminuindo a degradação de partículas virais. No entanto, este estudo permitiu concluir que a endocitose do HIV-1 em astrócitos não é um

processo eficiente, dado que a utilização destes fármacos não aumentou a suscetibilidade à infecção além de 0,5%. A internalização vesicular das partículas de HIV-1 em astrócitos, independente do recetor viral CD4, proporciona, assim, resistência ao estabelecimento de infecção produtiva (85).

No geral, as observações decorrentes dos diferentes estudos realizados sugeriram que na infecção natural de astrócitos pelo HIV-1, um número adequado de partículas virais é aprisionado dentro de vesículas endocíticas, mas devido à destruição aumentada ou fuga limitada das partículas virais a partir dos endolisossomas, podem apenas estabelecer infecção pouco produtiva (74). Assim, embora a via endossomal seja indispensável no estabelecimento de infecção pelo HIV-1 em astrócitos, é, simultaneamente, prejudicial, porque o invólucro viral é sensível ao pH ácido dos endolisossomas. Considera-se, portanto, que a endocitose natural do HIV-1 em astrócitos é uma via ineficaz para o estabelecimento de infecção produtiva (74,85).

4.2.2 Restrições intracelulares da replicação do HIV-1 em astrócitos

Para além da via endocítica natural providenciar alguma resistência intracelular ao HIV-1, como enunciado anteriormente, vários outros fatores intracelulares foram implicados na restrição do estabelecimento de infecção produtiva em astrócitos (85). Considera-se que a restrição intracelular mais significativa é o comprometimento da normal função da proteína Rev do HIV-1, envolvida no transporte de transcritos de mRNA viral do núcleo para o citoplasma (98). Este comprometimento é efetuado por uma proteína moduladora da atividade da Rev e que foi denominada por RISP (Rev interacting shuttling protein). Demonstrou-se que a RISP está presente em níveis elevados em astrócitos e que condiciona a replicação do HIV-1 nestas células, uma vez que a sua supressão permite a replicação viral eficiente (99). Uma outra proteína, a TRBP (HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein), envolvida na inibição da ativação da PKR (Protein Kinase RNA-activated) e um componente essencial no processamento de micro RNAs (miRNAs) parece estar naturalmente subexpressa em astrócitos, sendo que essa subexpressão foi implicada na replicação restrita do HIV-1 nestas células (100,101). Em várias investigações realizadas, a suplementação ectópica de astrócitos com TRBP resultou na normalização da replicação viral, que ocorreu devido à reversão da supressão induzida pela PKR da

atividade do promotor LTR do HIV-1 (101,102). Contudo, a utilização de estratégias como a introdução de um clone molecular infeccioso de HIV-1 em astrócitos (de modo a colocar de parte possíveis restrições associadas à entrada viral), levaram ao desenvolvimento de replicação viral robusta e à liberação de partículas virais infecciosas para o meio extracelular (88). Estes resultados permitiram concluir que, embora a expressão de alguns fatores regulatórios esteja comprometida em astrócitos, o ambiente intracelular é propício para a replicação do HIV-1, uma vez que se a entrada viral for realizada por uma via alternativa à endocitose não se verifica grande resistência intracelular ao estabelecimento de infecção produtiva (85).

5 Lesão do SNC

O HIV-1, uma vez presente no SNC, pode ser responsável por desencadear várias disfunções neurológicas. Embora a lesão e a perda neuronal sejam os principais fatores associados à neuropatologia e ao declínio neurocognitivo verificados em indivíduos infectados pelo HIV-1, o vírus não infeta produtivamente os neurónios e os seus efeitos sobre estas células são descritos como indiretos. Assim, as proteínas virais libertadas a partir de células infectadas no SNC são uma fonte bem caracterizada de toxicidade neuronal e, do mesmo modo, as citocinas e quimiocinas inflamatórias derivadas do hospedeiro e libertadas a partir de células ativadas (infectadas ou não infectadas) podem também comprometer o normal funcionamento neuronal (103).

5.1 Mecanismos de dano e perda neuronal causados pelo HIV-1

Dado que os sintomas de HAND estão intimamente relacionados com o dano e perda neuronal e tendo em conta que o HIV-1 é incapaz de infetar neurónios, outros mecanismos alternativos à infeção direta parecem mediar a neuropatogénese da infeção pelo HIV-1 (51). Embora as células neuronais não expressem o recetor CD4 (68), apresentam vários recetores de superfície celular que as tornam sensíveis aos danos provocados por proteínas virais, citocinas, quimiocinas e pequenos metabolitos secretados por células gliais infectadas e/ou ativadas presentes no cérebro (17).

Atualmente, dois modelos principais estão associados à neurodegeneração e ao desenvolvimento de sintomas neurológicos nos HAND: o modelo direto e o modelo indireto. Ambos requerem o estabelecimento de infeção produtiva inicial de macrófagos perivasculares e da micróglia e não são mutuamente exclusivos (51), sendo provável que uma combinação de efeitos diretos e indiretos do HIV-1 cause a neurotoxicidade e a disfunção subjacentes aos HAND (35).

5.1.1 Modelo direto

O modelo direto propõe que as proteínas virais libertadas a partir de células derivadas de monócitos infectadas causam dano ou morte neuronal através da interação direta dessas proteínas com os neurónios (104,105). A vulnerabilidade das células

neuronaais às proteínas dos HIV-1 é principalmente mediada pela presença de vários recetores à superfície destas células, nomeadamente o NMDAR, o recetor da lipoproteína de baixa densidade (LRP), os recetores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 e o transportador de dopamina (17).

A neurotoxicidade não é necessariamente induzida pela exposição longa e contínua às proteínas virais, uma vez que a exposição transitória pode ser suficiente para iniciar uma cascata de eventos que resultam em danos neuronaais (106). Algumas proteínas do HIV-1 podem perturbar a homeostase iónica e despolarizar os neurónios, interromper o normal funcionamento das membranas neuronaais e, em última instância, induzir a apoptose (103). As duas principais proteínas virais que interagem com os recetores descritos e que contribuem para a neurotoxicidade do HIV-1 são a gp120 e a Tat (17). A gp120 tem a capacidade de se ligar diretamente ao NMDAR em neurónios, podendo gerar correntes eléctricas pós-sinápticas excitatórias através do influxo de iões Ca^{2+} (107). Para além disso, esta proteína viral pode ligar-se também ao CCR5 ou ao CXCR4 e induzir a ocorrência de apoptose (108). Esta morte celular programada é mediada por uma cascata de sinalização que envolve a p38-MAPK (109). A interação da gp120 com o recetor CXCR4 resulta ainda na regulação positiva do recetor nicotínico neuronal $\alpha 7$, que aumenta a permeabilidade ao influxo de Ca^{2+} e contribui para a morte celular (110) (Figura 5).

A proteína viral Tat também é responsável por causar neurotoxicidade utilizando múltiplas vias (Figura 6). À semelhança da gp120, a Tat pode ativar os NMDAR e impulsionar o influxo tóxico de iões Ca^{2+} , interrompendo a homeostase deste ião (111). Adicionalmente, a Tat pode induzir a ativação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) mediada pela fosfolipase C (PLC), o que constitui um mecanismo alternativo de desregulação do Ca^{2+} que contribui para a toxicidade neuronal, devido à mobilização das reservas deste catião presentes no retículo endoplasmático (112). O LRP, um recetor envolvido no tráfego de colesterol nos neurónios, desempenha um papel fundamental na inibição da apoptose neuronal (113). Contudo, a Tat tem a capacidade de se ligar a este recetor, causando a sua internalização e comprometendo a entrada dos seus ligandos naturais, como o péptido β -amilóide ($\text{A}\beta$) e a apolipoproteína E (ApoE) (114). Esta interação entre a Tat e o LRP induz ainda a formação de um complexo promotor da apoptose, constituído pela proteína 95 de densidade pós-sináptica (PSD-95), pelo NMDAR e pela sintetase do óxido nítrico neuronal (nNOS) (115). A Tat pode ainda interferir na

recaptação da dopamina através da interação com o seu transportador, o que contribui para o dano neuronal encontrado nas regiões com maior abundância deste neurotransmissor no cérebro de pacientes com HAND (116,117). Mais recentemente, estudos demonstraram que a disfunção neuronal mediada pela Tat depende, em parte, de pequenas moléculas de miRNA não codificante. A exposição de neurónios a esta proteína viral parece induzir especificamente a expressão do miR-34a, acrescentando um outro nível através do qual a Tat pode regular a maquinaria da célula hospedeira (118).

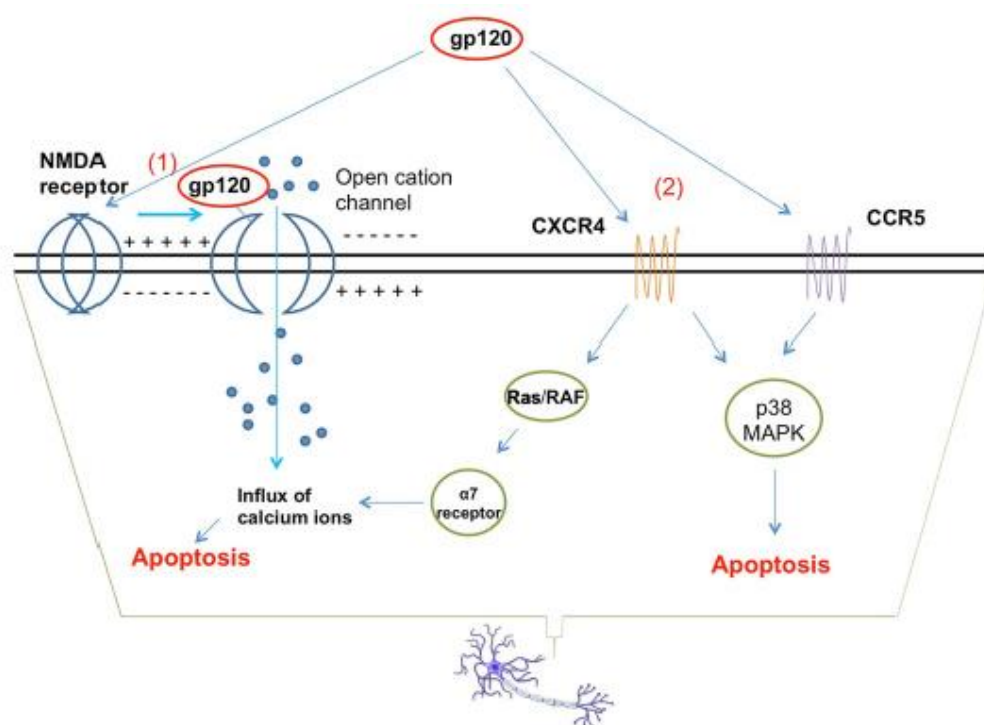


Figura 5 Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela gp120. [1] A gp120 pode ligar-se ao NMDAR e induzir a abertura excessiva de canais iônicos associados a este recetor, permitindo o influxo de iões Ca²⁺ em níveis tóxicos. [2] A gp120 pode ligar-se diretamente ao CCR5 ou ao CXCR4 e ativar uma cascata de sinalização mediada pela p38-MAPK que induz apoptose neuronal. A ligação entre a gp120 e o CXCR4 também desencadeia a regulação positiva do recetor nicotínico α7, que contribui para o aumento da permeabilidade celular ao influxo de iões Ca²⁺. Todos estes mecanismos desencadeiam a ocorrência de apoptose neuronal. Adaptado de (17).

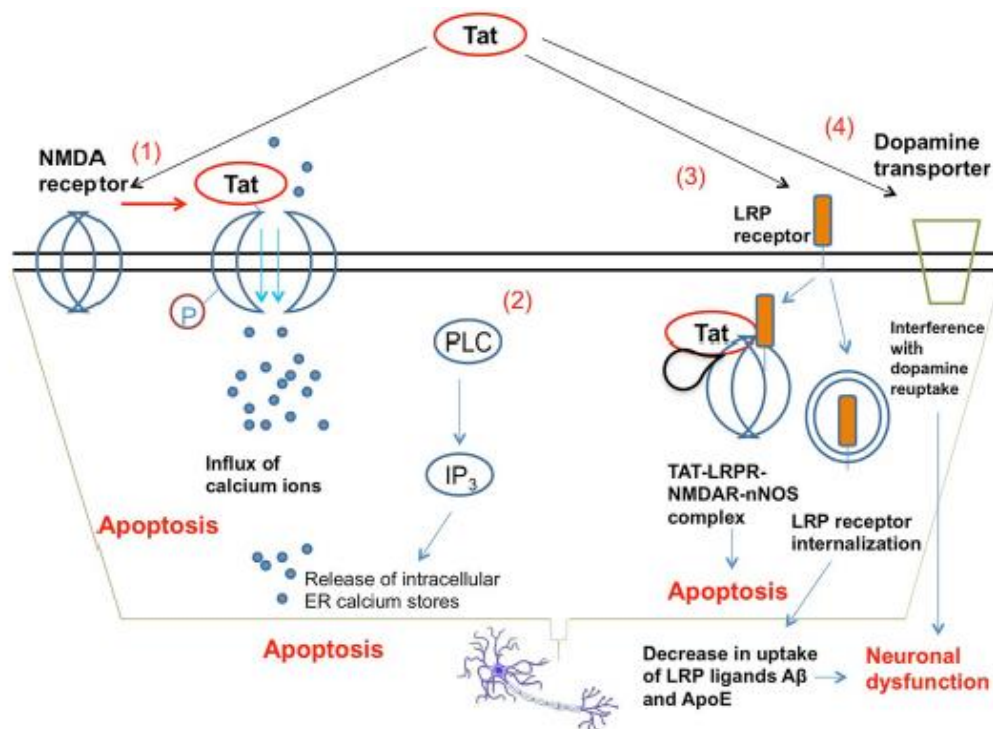


Figura 6 Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela Tat. [1] A ligação estabelecida entre a proteína Tat e o NMDAR leva à fosforilação da subunidade intracelular deste recetor, causando a abertura excessiva de canais catiónicos e, consequentemente, a acumulação intracelular tóxica de Ca^{2+} . [2] A Tat tem também a capacidade de ativar a PLC, impulsionando a libertação de níveis tóxicos de Ca^{2+} mediada pelo IP_3 a partir das reservas do retículo endoplasmático. [3] A Tat pode ligar-se ao recetor LRP e integrar-se num complexo macromolecular que inclui o NMDAR e a nNOS, induzindo a apoptose celular. Alternativamente, a Tat pode propiciar a internalização do recetor LRP, comprometendo a entrada neuronal dos ligandos deste recetor e contribuindo para a disfunção neuronal. [4] A Tat interfere ainda com a atividade do transportador de dopamina, diminuindo a recaptação deste neurotransmissor pelos neurónios pré-sinápticos e comprometendo a transmissão do sinal. Adaptado de (17).

5.1.2 Modelo indireto

O modelo indireto de lesão e perda neuronal baseia-se na ação de fatores solúveis, potencialmente neurotóxicos, libertados por células não neuronais como parte da resposta inflamatória às partículas virais. Os macrófagos e a micróglia, uma vez infectados produtivamente pelo HIV-1, libertam várias moléculas solúveis, como o

glutamato, o ácido quinolínico, o ácido araquidónico, o fator ativador de plaquetas (PAF), o NO, aniões superóxido, MMPs, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que comprometem o normal funcionamento dos neurónios (104,119). A expressão elevada destas moléculas é indicativa de uma inflamação neuronal contínua que, por sua vez, promove a encefalopatia associada aos HAND (71).

5.1.2.1 Efeitos das citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias

Uma vez estabelecida a infeção pelo HIV-1, os macrófagos e a micróglia libertam um conjunto de fatores neurotóxicos que contribuem para a lesão neuronal, incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e pequenas moléculas. Entre as várias citocinas induzidas pelo HIV-1 destacam-se o TNF- α , a IL-1 β , a IL-6 e o IFN- α (17). O TNF- α está envolvido na inibição da absorção de glutamato pelos astrócitos, causando a acumulação extracelular deste neurotransmissor (120). A IL-1 β é responsável pela desregulação da produção de glutamato nos neurónios através da indução da glutaminase (121). A IL-6 está associada à formação de vacúolos citoplasmáticos em neurónios, perturbando o seu normal funcionamento e níveis excessivos de IFN- α estão relacionados com o desenvolvimento e a gravidade da HAD (17).

No que diz respeito às quimiocinas libertadas pelos macrófagos e microglia ativados devido à infeção pelo HIV-1, existem dois grupos principais que devem ser destacados: as α - e as β -quimiocinas. Vários estudos encontraram níveis elevados das α -quimiocinas CXCL10 e CXCL12 no cérebro e LCR de pacientes com HAD. As α -quimiocinas, expressas no SNC mesmo em condições normais, ligam-se aos recetores CXCR, induzindo um aumento do Ca²⁺ intracelular dependente da proteína G_i. Contudo, as α -quimiocinas podem ter tanto efeitos neuroprotetores como neurotóxicos, dependendo das condições (51). Por exemplo, a CXCL12 atua na melhoria da transmissão sináptica, mas quando é clivada por MMPs, muda a sua especificidade do recetor CXCR4 para o CXCR3, o que aumenta as funções neurotóxicas desta quimiocina (122). Da mesma forma, a CXCL10, que atua através da ligação ao CXCR3 sem necessidade de clivagem proteolítica prévia, induz o aumento do Ca²⁺ intracelular e a ativação da caspase-3, que levam à ocorrência de apoptose neuronal (123). Ao

contrário das α -quimiocinas, as β -quimiocinas são expressas em baixos níveis no cérebro, em condições normais. No entanto, após a infecção do SNC pelo HIV-1, várias β -quimiocinas são encontradas em concentrações aumentadas: MCP-1, CCL3, CCL4 e CCL5 (124). As β -quimiocinas atuam através da ligação aos recetores CCR e, como as α -quimiocinas, são capazes de induzir tanto funções neuroprotetoras como neurotóxicas (125). Enquanto a CCL3, a CCL4 e a CCL5 têm um efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida pela gp120 in vitro, a MCP-1 está associada a um aumento do risco de HAND, devido ao seu efeito quimioatrator de monócitos (126,127).

Além das quimiocinas já referidas, níveis elevados de CX3CL1, um membro da família CX3C de quimiocinas, foram observados no LCR de indivíduos com HAND (128). A CX3CL1 atua através da ligação direta a BMVECs, mediando a ligação de monócitos e a sua migração através da BHE (129). No entanto, além deste efeito cerebral negativo, a CX3CL1 parece estar também associada à proteção contra a neurotoxicidade induzida pelo HIV-1 (130). Desta forma, tendo em conta os possíveis papéis neuroprotetores e neurotóxicos associados à expressão de quimiocinas, apenas um equilíbrio delicado das suas funções determinará o efeito da resposta inflamatória induzida pelo HIV-1 sobre os neurónios (51).

5.1.2.2 Excitotoxicidade

A excitotoxicidade baseia-se no processo através do qual níveis excessivos de um neurotransmissor excitatório ou de uma substância análoga provocam períodos prolongados de despolarização da membrana neuronal, com consequente aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e ativação de proteases e outras enzimas que comprometem a integridade dos componentes celulares. A excitotoxicidade no SNC é geralmente provocada pelo glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do cérebro, e é mediada pelo NMDAR (17,51).

Na infecção cerebral provocada pelo HIV-1, os macrófagos ativados libertam moléculas excitotóxicas, nomeadamente o glutamato, que atuam sobre os NMDAR, podendo resultar na ativação excessiva destes recetores e no influxo tóxico de iões Ca^{2+} a nível neuronal (131,132). Além disso, os macrófagos ativados libertam fatores que atuam de forma parácrina para estimular outras células do SNC, como os astrócitos e a microglia. Dado que os astrócitos desempenham um papel importante na regulação das

concentrações extracelulares de glutamato no cérebro, quando são ativados esta função é alterada (133). Assim, a alteração da libertação de glutamato parece ser uma via importante de neurodegeneração em doenças inflamatórias cerebrais, tal como a infeção provocada pelo HIV-1 (134).

5.1.2.3 Stress oxidativo

Para além da neuroinflamação e da excitotoxicidade, várias evidências têm sustentado o importante papel do stress oxidativo na indução da morte neuronal no modelo indireto de neurodegeneração dos HAND (51). O stress oxidativo provoca alterações no metabolismo dos lípidos, com consequente produção de moléculas como a ceramida, a esfingomielina e o hidroxinoneal, todas encontradas em indivíduos com HAND (135). As proteínas do HIV-1 parecem aumentar o stress oxidativo em neurónios, por induzirem disfunção mitocondrial e estabelecerem interações com proteínas ligadas à membrana plasmática e ao citosol. Mostrou-se que a gp120 está envolvida na produção glial de ROS e na morte neuronal, sendo que ambos os processos podem ser bloqueados com a utilização de um agente antioxidante (51). Vários estudos têm demonstrado as capacidades neuroprotetoras de antioxidantes *in vitro* e as propriedades terapêuticas de antioxidantes *in vivo* em pacientes infetados com o HIV-1, mostrando a inibição da deterioração mental e a melhoria do estado de saúde geral (51,136). Este facto sugere que a resposta antioxidante celular pode servir, no futuro, como um potencial alvo terapêutico nesta patologia.

5.1.2.4 Efeitos das proteínas virais

As proteínas virais, embora estejam normalmente envolvidas no estabelecimento de neurotoxicidade por ação direta nos neurónios, podem também ativar as células gliais e causar danos à distância por mecanismos indiretos. Além disso, as proteínas do HIV-1 podem atuar em sinergia com outras substâncias, amplificando o seu potencial de neurotoxicidade (106). A gp120, além de estar diretamente envolvida na patogenicidade provocada pelo HIV-1, induz também danos neuronais por mecanismos indiretos, ao estimular a libertação de citocinas inflamatórias e substâncias tóxicas (71). Esta proteína viral pode alterar a expressão de toll-like receptors (TLRs) em astrócitos, favorecendo a libertação de TNF- α , IL-6, CCL5 e ROS (137).

A Tat é uma proteína viral que apresenta a propriedade de ser, por si própria, quimioatratadora de monócitos. No entanto, embora possa atuar diretamente como uma quimiocina, esta proteína estimula também a secreção de MCP-1 pelos astrócitos, atuando de forma direta e indireta no influxo de monócitos para o SNC. A Tat induz ainda a liberação de TNF- α pelos macrófagos, um mediador inflamatório envolvido na ativação de células cerebrais e no aumento da expressão de MCP-1, citocinas inflamatórias, e moléculas de adesão celular (ICAM-1 e VCAM-1) (57). De acordo com estudos efetuados, esta proteína viral parece regular positivamente a expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP), envolvida na indução do stress oxidativo em astrócitos (138). Para além disso, demonstrou ter um papel importante na regulação positiva do gene humano Cx43 que está envolvido, se expresso de forma excessiva, na apoptose e neuroinflamação (139).

A proteína Vpr do HIV-1, para além de desempenhar diferentes papéis durante o ciclo de vida viral, é conhecida por aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-8 em macrófagos. Assim, esta proteína está indiretamente envolvida na apoptose, uma vez que a IL-1 β e a IL-8 induzem a liberação de neurotoxinas, como as MMPs, e promovem a ação de proteínas do ciclo celular e pró-apoptóticas (140).

5.2 Consequências da neuroinflamação crónica

A associação verificada entre a abundância de macrófagos/micróglia ativados no SNC, o dano neuronal e a disfunção cognitiva sugere que a neuroinflamação resultante da ativação imunitária sistémica desencadeia a neurodegeneração observada nos HAND (51). Desta forma, têm sido destacadas algumas consequências da neuroinflamação persistente encontrada em indivíduos infetados com o HIV-1, dando-se especial ênfase à disrupção sináptica e ao comprometimento da neurogénese, cujo estudo é essencial para compreender os mecanismos de progressão da doença.

5.2.1 Disrupção sináptica

Os HAND, para além de serem uma consequência direta da morte neuronal, estão também associados a danos neuronais, nomeadamente a rutura sináptica. A inflamação

e a excitotoxicidade são, atualmente, considerados os principais mecanismos que podem desencadear esse dano sináptico associado à infecção pelo HIV-1. A ativação de proteases dependentes de Ca^{2+} que perturbam a densidade pós-sináptica é um mecanismo provável pelo qual o normal funcionamento das sinapses pode ser comprometido no SNC infectado pelo HIV-1 (51).

As moléculas inflamatórias libertadas a partir de macrófagos/micróglia e astrócitos infectados pelo HIV-1 induzem a ativação de NMDARs, assim como a ativação de recetores de glutamato metabotrópicos (mGluR), recetores de tirosina quinases (RTK), canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) e outros recetores acoplados a proteínas G (GPCR). O influxo excessivo de Ca^{2+} , bem como a libertação de Ca^{2+} intracelular através de recetores de IP3, conduz à ativação de calpaínas e de outras proteases dependentes de Ca^{2+} , que são conhecidas por clivarem proteínas de densidade pós-sináptica, como a PSD-95, levando a disfunção neuronal (51). Assim, a clivagem da PSD-95 é um passo importante no desenvolvimento de danos sinápticos e a diminuição dos níveis desta proteína é considerado um sinal distintivo de neurodegeneração (141).

5.2.2 Comprometimento da neurogénese

O SNC é um local altamente complexo e dinâmico, onde novos neurónios são formados continuamente em indivíduos adultos através do processo de neurogénese adulta (ANG) (142). Várias evidências demonstraram que a ANG está envolvida nos processos de aprendizagem e memória, no olfato e nos comportamentos relacionados com a ansiedade, funções essas que estão comprometidas em indivíduos com HAD (51,143). Estes dados evidenciam que a interrupção da normal ANG está associada ao desenvolvimento de HAND, bem como de outras doenças neurodegenerativas (144).

A infecção pelo HIV-1 induz vários processos através dos quais a ANG pode ser prejudicada. Um desses processos consiste na alteração da normal função dos astrócitos, nomeadamente ao nível do suporte que estas células fornecem aos neurónios, o que pode afetar a migração de células progenitoras neuronais (NPCs) e de neurónios imaturos ao longo do seu trajeto (51). A maquinaria do ciclo celular desempenha também um papel importante na regulação da migração das NPCs, tendo sido verificado que certas proteínas reguladoras, como o fator de transcrição E2F1, exibem padrões de

expressão alterados em análises de tecidos pós-mortem de indivíduos com HAND (145,146). A função alterada do fator E2F1 pode causar a interrupção da ANG, uma vez que esta proteína está envolvida na regulação da doublecortina (DCX), uma proteína dos microtúbulos expressa em neurónios imaturos (147).

Outro mecanismo através do qual o HIV-1 pode prejudicar a ANG é através da alteração das vias de sinalização da insulina (51). A nível cerebral, esta hormona atua como um neuromodulador, afetando a plasticidade sináptica e a libertação de neurotransmissores (148). Dado que as NPCs do hipocampo expressam recetores de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), parece evidente o papel fundamental destes dois intervenientes na estimulação e modulação da ANG (51). Ao contrário do espectável, tanto os pacientes em regime de cART como os que não são sujeitos a qualquer terapêutica apresentam distúrbios metabólicos pronunciados, que incluem alterações na sinalização da insulina, na homeostase da glucose e na distribuição lipídica (149–151). Esta situação ocorre porque alguns fármacos antirretrovirais, bem como outros utilizados para tratar perturbações comportamentais na HAD, podem causar uma forma prolongada de resistência à insulina (149,152). Alguns desses medicamentos ligam-se ao domínio quinase do recetor de insulina ou reduzem os Kv, que são conhecidos por afetar a sensibilidade à glucose e a sinalização da resposta à insulina (153,154). Este pode ser um dos fatores pelos quais os HAND continuam a progredir nos pacientes em regime de cART.

5.3 Determinantes genéticos do hospedeiro na neurotoxicidade provocada pelo HIV-1

A identificação de uma subpopulação de sobreviventes de longo prazo infetados pelo HIV-1 sugeriu a possibilidade de que fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar a patogénese viral. Múltiplos estudos confirmaram o impacto protetor da mutação CCR5 Δ 32 na doença provocada pelo HIV-1 e identificaram polimorfismos genéticos adicionais que alteram a progressão da doença e a suscetibilidade ao comprometimento neurocognitivo (4). Tal como referido anteriormente, o CCR5 é expresso em células-alvo potenciais do HIV-1 e serve como um co-recetor predominante para a entrada viral durante os estadios iniciais e a transmissão da infeção. A mutação homozigótica Δ 32 no gene CCR5 previne a expressão do CCR5 na

superfície celular e, assim, confere resistência à infecção por estirpes de HIV-1 com tropismo para este co-recetor (155). Uma mutação pontual (V64I) identificada na região de codificação do CCR2 foi associada a uma progressão mais lenta da doença e também a uma menor progressão do comprometimento neurocognitivo, embora não apresente qualquer impacto na transmissão do HIV-1 (156,157). A variação genética da MCP-1 está também envolvida na alteração da patogénese viral. A mutação homozigótica do alelo 2578G no gene que codifica para a MCP-1 foi associada a uma redução de 50% do risco de adquirir infecção pelo HIV-1. No entanto, uma vez estabelecida a infecção viral, o mesmo genótipo foi associado à progressão rápida da doença e a um risco aumentado de desenvolvimento de HAND. Dado que esta mutação resulta no aumento da produção transcricional de MCP-1, o maior risco de se verificar comprometimento neurocognitivo é explicado pelo maior influxo de células monocíticas para o SNC induzido pela ação desta quimiocina (158).

5.4 Exossomas: uma via alternativa da neurodegeneração provocada pelo HIV-1

Embora vários fatores tenham sido identificados como instigadores da neurodegeneração associada ao HIV-1, a ideia de que a patogénese desta doença pode ser acelerada ou mediada por exossomas e pelas respetivas cargas associadas tem ganhado uma elevada importância recentemente (159). Os exossomas são nanovesículas extracelulares (30-100 nm de diâmetro) formados a partir de membranas endossomais e libertados pela maioria das linhagens celulares do SNC, tanto na homeostase normal como em condições patológicas (160). Embora se tenha pensado inicialmente que a função dos exossomas era apenas restrita à eliminação de proteínas celulares excessivas e moléculas indesejáveis, especialmente em células com baixa atividade lisossomal, nos últimos anos têm sido várias as evidências que demonstram o seu papel como vesículas transportadoras de carga que medeiam a comunicação entre diferentes células e tecidos (159,161,162). Tendo em conta a importância destas vesículas na comunicação célula-a-célula, o seu papel na regulação de doenças neurodegenerativas tem sido reconhecido devido à capacidade de transmitirem fatores neurotóxicos e outros agentes causadores de doença, facilitando a sua disseminação para regiões não afetadas (159,163).

Os exossomas têm uma origem endocítica, formando-se a partir de endossomas precoces que, por sua vez, formam corpos multivesiculares (MVBs) que contêm no seu interior vesículas intraluminais (ILVs). Os MVBs fundem-se com a membrana celular da célula hospedeira para libertar as ILVs como exossomas, juntamente com o seu conteúdo, no espaço extracelular. Alternativamente, o endossoma precoce pode fundir-se com um lisossoma, onde o conteúdo do MVB é degradado e reciclado dentro da própria célula (Figura 7) (164). A composição específica de um exossoma depende, em grande parte, da célula que lhe deu origem, e pode variar de acordo com fatores celulares e ambientais (159). Os exossomas são conhecidos por transportarem macromoléculas, nomeadamente ácidos nucleicos (DNA, mRNA, miRNA), proteínas funcionais (incluindo as de origem viral) e outros produtos celulares, e podem atuar como mensageiros parácrinos que afetam as células adjacentes ou como mensageiros endócrinos que circulam na corrente sanguínea (159,164).

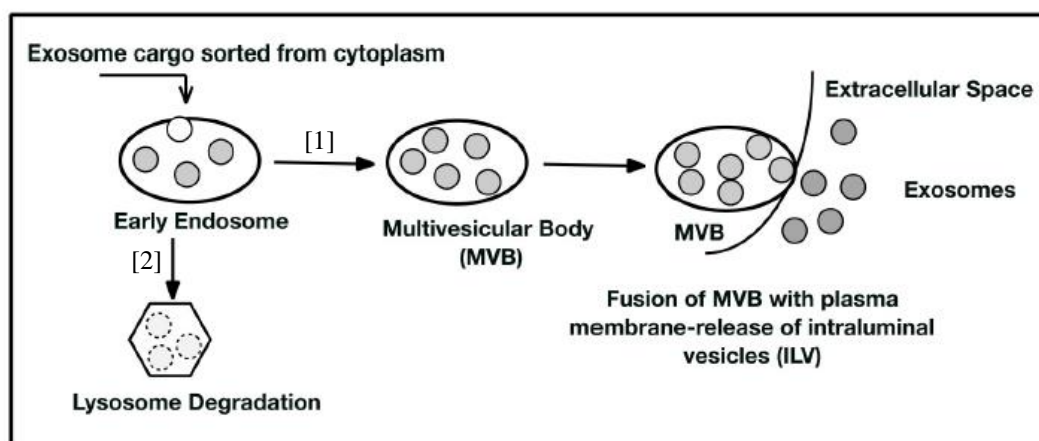


Figura 7 Biogênese dos exossomas. A carga citoplasmática é selecionada e introduzida em endossomas precoces. [1] O endossoma origina um MVB que contém no seu interior inúmeras ILVs. O MVB transporta as ILVs para o lado citoplasmático da membrana da célula hospedeira e funde-se com ela, libertando as ILVs para o espaço extracelular na forma de exossomas. [2] Em alternativa, o endossoma precoce pode entrar na via de degradação lisossomal, onde o seu conteúdo é destruído e reciclado. Adaptado de (164).

Os exossomas, para além de estarem envolvidos em processos necessários para o normal funcionamento do SNC, também contribuem para a patogénese de vários distúrbios neuroinflamatórios, tendo sido demonstrado o seu papel na propagação de infeções virais (165). Os retrovírus são conhecidos por explorarem a maquinaria de

comunicação intercelular das células hospedeiras para se evadirem da vigilância imunitária, o que facilita a disseminação viral. Isso pode ser realizado utilizando vários mecanismos, nomeadamente através do envolvimento de vesículas extracelulares (166). O HIV-1 desenvolveu várias estratégias mediadas por exossomas de forma a manipular a maquinaria celular do hospedeiro, considerando-se que estas vesículas atuam como facilitadores para o estabelecimento de infecção (167). A hipótese do “exossoma de Tróia” sugere que os exossomas têm capacidade para facilitar a disseminação viral de uma forma independente de recetor e independente do Env, fornecendo aos retrovírus a possibilidade de explorar vias intracelulares de transporte vesicular (168).

Embora a disseminação viral através de exossomas seja considerado um processo de baixa eficiência e anteriormente desvalorizado, este continua a ser um modo de infecção importante devido às implicações que apresenta na modulação da resposta imunitária do hospedeiro. Quando as partículas virais estão camufladas no interior dos exossomas, os retrovírus têm a capacidade de contornar a resposta imunitária adaptativa, o que pode ajudar a explicar a resistência a anticorpos neutralizantes observada na infecção pelo HIV-1. Este parece ser o motivo pelo qual as vacinas contra antígenos retrovirais não são suscetíveis de fornecer proteção profilática (168).

Tanto a libertação de exossomas como a composição exossomal são reguladas por vias de sinalização celular ativadas por diferentes fatores, incluindo a infecção pelo HIV-1 e a respetiva ativação imunitária (159). Estudos em larga escala revelaram que os exossomas libertados a partir de células infetadas pelo HIV-1 possuem moléculas reguladoras distintas e são compostos por proteínas únicas e quantitativamente diferentes às encontradas em exossomas libertados por células não infetadas (169). Especificamente, as proteínas virais Nef e Gag foram encontradas em exossomas libertados por células infetadas pelo HIV-1 e demonstrou-se que os exossomas contendo a proteína Nef foram capazes de se fundir com células espectadoras, induzindo a ocorrência de apoptose (170). Além disso, demonstrou-se ainda que a proteína Tat também está presente em exossomas derivados de astrócitos infetados pelo HIV-1 que podem ser absorvidos pelos neurónios, levando a lesões e morte neuronal (171).

Outros aspetos da patologia provocada pelo HIV-1 podem ser induzidos por exossomas, nomeadamente a neuroinflamação e neurodegeneração observadas nos HAND, que parecem estar relacionadas com moléculas de RNA transportadas por estas vesículas (165). Num estudo efetuado demonstrou-se que miRNAs específicos, como o miR-29b, foram transportados por vesículas extracelulares a partir de astrócitos tratados com morfina e Tat do HIV-1 para os neurónios, e que essa transferência provocou uma regulação negativa do PDGF-B (alvo do miR-29b) nos neurónios, resultando em apoptose neuronal (172). Demonstrou-se também que os exossomas isolados a partir do cérebro de macacos rhesus infetados com o vírus da imunodeficiência símia (SIV) manifestaram um aumento da expressão do miR-21 em comparação com os controlos não infetados, o que resultou em neurotoxicidade por ativação de uma via de morte celular dependente do TLR7 (173) (Figura 8).

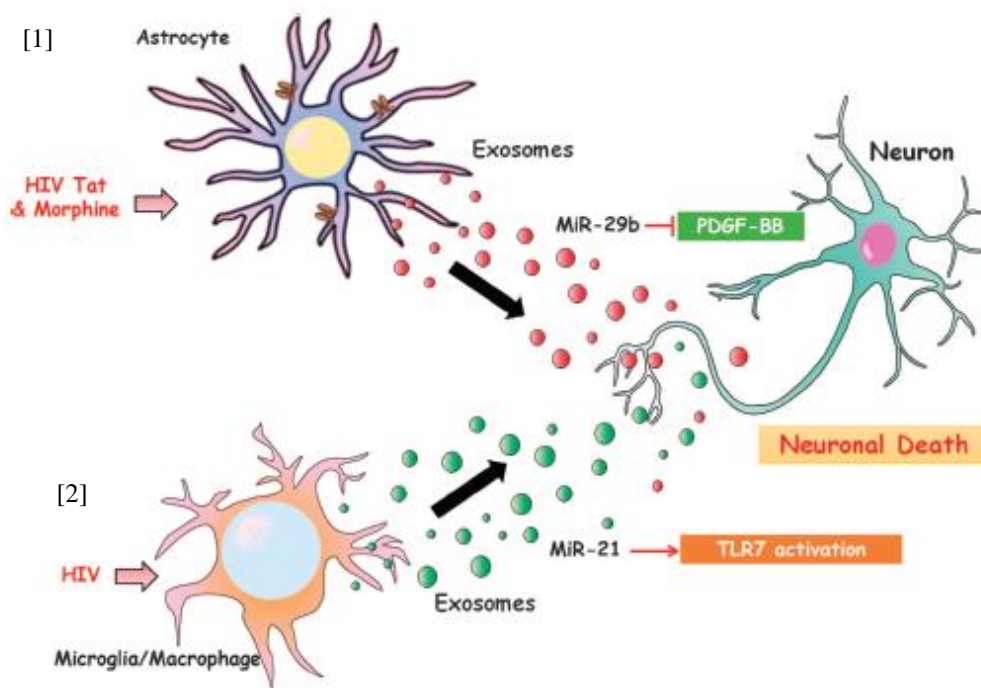


Figura 8 Papel dos miRNAs na neurotoxicidade provocada pelo HIV-1. [1] Os exossomas libertados por astrócitos tratados com morfina e Tat transportam o miR-29b, que pode ser absorvido por neurónios, resultando em morte neuronal devido à regulação negativa do PDGF-B. [2] O miR-21 presente em exossomas libertados pela microglia/macrófagos infetados pelo HIV-1 induz neurotoxicidade através da via de sinalização TLR7. Adaptado de (159).

6 Biomarcadores de lesão do SNC

Ainda que as experiências *in vitro* e em modelos animais tenham sido fundamentais na compreensão da neuropatogénese do HIV-1, a informação clínica parece ser crítica para entender de que modo o vírus afeta o cérebro humano. Tendo em conta a dificuldade de obtenção de amostras diretas de tecido cerebral a partir de indivíduos vivos infetados pelo HIV-1, o desenvolvimento de biomarcadores de progressão da doença tornou-se clinicamente relevante. Nos últimos anos, marcadores moleculares e de neuroimagem têm sido reconhecidos como importantes biomarcadores nos HAND (35).

6.1 Marcadores moleculares

O LCR é identificado como um local potencialmente importante, a partir do qual podem ser feitas medições dos processos patológicos a decorrer no SNC (35). A medição dos níveis de RNA do HIV-1 neste fluido biológico constitui a forma mais prática de avaliar a carga viral no SNC, sendo evidente que uma maior carga viral está diretamente relacionada com o desenvolvimento de sintomas neurológicos. Já os pacientes sem doença neurológica ativa demonstraram ter uma carga viral significativamente diminuída no LCR, em comparação com o sangue periférico (38,174).

Com o reconhecimento de que os marcadores de ativação e inflamação celular são indicadores úteis de progressão da doença na infeção sistémica provocada pelo HIV-1, tornou-se clara a utilidade de efetuar a medição desses marcadores no compartimento do SNC. Marcadores solúveis de neurodegeneração e de ativação de macrófagos (como a neopterina e a β -2-microglobulina), quimiocinas que estimulam a difusão de macrófagos e linfócitos através da BHE (MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10) e moléculas envolvidas em diferentes vias de substituição e ativação celular no SNC são utilizadas para monitorizar processos subjacentes à neuropatologia dos HAND (38,175). Contudo, no caso da neopterina, embora os níveis moderadamente elevados no LCR sejam preditivos de progressão subsequente para HAD, este marcador de ativação crónica de macrófagos não é suficientemente sensível nem específico para auxiliar no diagnóstico ou na monitorização da neuro-SIDA (176).

Recentemente, tem-se dado especial atenção a marcadores plasmáticos relacionados com a imunopatogénese sistémica do HIV-1, incluindo o LPS e o CD14 solúvel (sCD14). Níveis plasmáticos elevados de LPS, que resultam da translocação de produtos bacterianos a partir do intestino, são uma causa provável da ativação imunitária verificada na infeção pelo HIV-1. O LPS desencadeia a ativação de monócitos através de sinalização mediada pelo CD14 e pelo TLR4, resultando na libertação de sCD14 e de citocinas pró-inflamatórias (177). Os níveis de sCD14, um marcador de ativação de monócitos, estão significativamente aumentados no sangue e LCR de indivíduos infetados pelo HIV-1 e com comprometimento cognitivo global (nomeadamente nos domínios de atenção e aprendizagem), o que sugere que este fator solúvel pode servir como um marcador potencialmente promissor dos HAND (37).

Os marcadores diretos de lesão neuronal encontrados no LCR, nomeadamente o neurofilamento de cadeia leve (NFL), podem servir também como medidas da neurodegeneração ou da lesão ativa verificada no SNC. O NFL não está apenas elevado nos estadios neuroassintomáticos da infeção pelo HIV-1, apresentando também níveis anormais em indivíduos infetados sob regime de cART supressora. Este facto sugere a ocorrência de lesões neuronais, mesmo em indivíduos sujeitos a tratamento (178).

Dada a necessidade de detetar os estadios precoces da neuropatogénese do HIV-1, novos biomarcadores de lesão do SNC continuam a ser investigados para otimizar a avaliação da infeção, sobretudo em pacientes com risco de desenvolverem HAND. Por exemplo, a dimetilarginina assimétrica (ADMA), um biomarcador de disfunção endotelial, está aumentada em indivíduos assintomáticos infetados pelo HIV-1. A ADMA pode estar associada à rutura da integridade da BHE e, consequentemente, ao desenvolvimento de HAND (35,179).

6.2 Técnicas de neuroimagem

Várias técnicas de neuroimagem têm sido fundamentais para demonstrar as alterações cerebrais decorrentes da infeção pelo HIV-1. Tendo em conta que podem fornecer informações úteis sobre a estrutura, metabolismo e metabolitos tanto na infeção viral primária como na infeção crónica, estes métodos constituem uma mais valia no estudo da progressão e desenvolvimento dos HAND (180).

6.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética (MRS)

A espectroscopia de ressonância magnética (MRS) está envolvida na detecção de processos celulares e bioquímicos com base na difusão de moléculas através de tecidos cerebrais. Como permite medir, de forma não invasiva, as concentrações de um conjunto específico de metabolitos, esta técnica deu a conhecer uma visão mais ampla dos processos inflamatórios e neuronais que ocorrem no SNC durante a infecção pelo HIV-1 (181,182).

As alterações da função metabólica em indivíduos infetados pelo HIV-1 ocorrem desde o início da progressão da doença e são demonstradas pelo aumento dos níveis de colina, de mio-inositol e ocasionalmente de creatina, mesmo nos estadios assintomáticos. As elevações destes metabolitos são interpretadas como marcadores de inflamação cerebral, de ativação glial e de astrocitose (182). Em estadios mais avançados da doença, nomeadamente em indivíduos com HAD, verifica-se uma redução dos níveis de N-acetilaspártato, especialmente na região frontal e subcortical do cérebro, indicando a diminuição da função neuronal (181,182).

Uma vez que as alterações metabólicas enunciadas podem ocorrer durante a infecção assintomática e não tratada provocada pelo HIV-1, a MRS é considerada um importante marcador pré-clínico da doença ativa do SNC (183).

6.2.2 Imagem de tensor de difusão (DTI)

A imagem de tensor de difusão (DTI) é uma técnica que tem vindo a obter bastante sucesso no estudo de doenças neurodegenerativas, pois permite caracterizar a estrutura dos feixes de substância branca. Alguns trabalhos utilizando esta técnica sugeriram que a infecção neuroassintomática provocada pelo HIV-1 origina reduções nas principais áreas de substância branca em diferentes regiões cerebrais, sobretudo na região frontal e no corpo caloso (184).

6.2.3 Ressonância magnética funcional (fMRI)

As imagens obtidas por ressonância magnética funcional (fMRI) parecem ser também essenciais no estudo da neuropatologia associada ao HIV-1. Esta técnica baseia-se na medição do fluxo sanguíneo cerebral e na determinação dos sinais de

dependência do cérebro relativamente ao nível de oxigénio presente no sangue. Estudos que utilizaram a fMRI mostraram uma redução do fluxo sanguíneo cerebral basal em pacientes infetados pelo HIV-1, que foi associada à gravidade dos sintomas cognitivos manifestados (185).

7 Manifestações clínicas do comprometimento neurocognitivo associado ao HIV-1

O HIV-1, após alcançar o SNC, pode causar uma vasta gama de complicações neurocognitivas que, no seu conjunto, são designadas por HAND. Dependendo do grau de deficiência manifestado, os HAND podem ser categorizados em três grupos principais: comprometimento neurocognitivo assintomático (ANI), comprometimento neurocognitivo ligeiro associado ao HIV (MND) e, no caso de pacientes que apresentem um compromisso funcional significativo, são classificados como portadores de HAD (Tabela 2). Atualmente, não existem dados conclusivos sobre os resultados da progressão dos HAND: verifica-se um grau variável de reversibilidade para o ANI e para o MND e, ao contrário das doenças neurodegenerativas típicas (como a Doença de Alzheimer), o MND não progride necessariamente para HAD (186).

Tabela 2 Critérios de classificação dos HAND. Adaptado de (186).

Distúrbio neurocognitivo diagnosticado	Desempenho funcional
Comprometimento neurocognitivo assintomático (ANI)	Não afeta as atividades da vida diária.
Comprometimento neurocognitivo ligeiro (MND)	Interfere com as atividades da vida diária, pelo menos ligeiramente (ex: ineficiência do trabalho, redução da acuidade mental).
Demência associada ao HIV (HAD)	Impacto marcado nas atividades da vida diária.

A introdução da cART levou a uma marcada alteração do paradigma de incidência de HAND: a incidência das formas de demência moderadas ou graves diminuiu significativamente e a gravidade da doença neurológica parece ter sido atenuada. Contudo, apesar deste efeito notável sobre as taxas de incidência das formas mais graves de HAD, a prevalência dos HAND continua a ser elevada (182). É ainda

de realçar que a taxa de comprometimento cognitivo leve a moderado permanece alta, mesmo em indivíduos que conseguiram a supressão viral como resultado de um tratamento ótimo (37). Vários fatores têm sido apontados para explicar a elevada prevalência dos HAND apesar da cART, entre os quais se destacam a possível neurotoxicidade de alguns fármacos antirretrovirais, a supressão viral incompleta no SNC devido à fraca penetração de certos fármacos através a BHE e/ou existência de estirpes virais resistentes, a presença de lesões cerebrais irreversíveis antes do início da terapêutica antirretroviral e o efeito da ativação imunitária crônica que provoca lesões metabólicas e vasculares no tecido cerebral (182,187).

As apresentações discretas dos HAND ligeiros a moderados e as alterações graduais que ocorrem durante um longo período de tempo fazem com que exista alguma dificuldade na deteção e monitorização dos sintomas destas perturbações, o que exige a utilização de ferramentas de avaliação abrangentes e sensíveis. A realização periódica de testes neuropsicológicos é útil para diagnosticar e avaliar a progressão dos HAND (37). Além disso, avaliações complementares, que incluem técnicas para obtenção de imagens cerebrais e análises de marcadores solúveis presentes no LCR, podem ser fundamentais na caracterização destes distúrbios, uma vez que possibilitam medições objetivas de alterações dependentes do tempo, da progressão da doença e da terapêutica instituída (187).

7.1 Demência associada ao HIV (HAD)

A HAD é uma complicação tardia da infeção pelo HIV e é diagnosticada quando se verificam declínios marcados na função de pelo menos dois domínios cognitivos diferentes, assim como evidências de deterioração funcional que afeta as atividades da vida diária e o autocuidado (182).

A apresentação da HAD inclui disfunção cognitiva, motora e comportamental, e sugere um envolvimento subcortical predominante. Nos estadios iniciais, a perda de memória, a lentificação psico-motora, as dificuldades de leitura e compreensão e a apatia são as queixas mais frequentes (Figura 9) (188) .

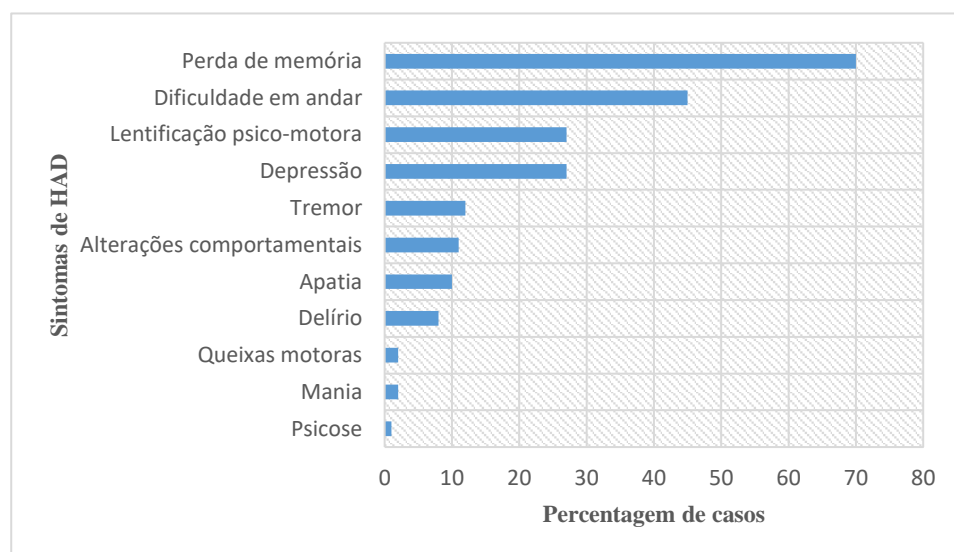


Figura 9 Frequência dos sintomas de HAD no estágio inicial da doença. Os dados foram obtidos a partir de um estudo efetuado em 300 indivíduos infectados pelo HIV e examinados pessoalmente no programa “JHU HIV Neurology”. Adaptado de (188).

Os casos de HAD descritos até à atualidade apresentam características clínicas distintas das demências “clássicas”, como a doença de Alzheimer e outras patologias neurodegenerativas corticais. O perfil neuropsicológico da HAD inclui alterações nas funções executivas (capacidade de planeamento e tomada de decisões), diminuição da concentração, atenção, memória verbal e memória de recordações e dificuldades de aprendizagem (182). As funções de linguagem primária geralmente não são afetadas pela HAD, a afasia grave raramente está presente, mas a fluência verbal é frequentemente prejudicada como uma expressão da disfunção executiva (189).

Os pacientes com HAD apresentam com alguma frequência um comprometimento das habilidades motoras, mesmo quando as funções cognitivas permanecem relativamente preservadas (182). As manifestações motoras de HAD incluem: lentificação psicomotora, marcha instável, perda de equilíbrio, falta de coordenação, tremores e comprometimento de habilidades motoras finas (como a caligrafia). A presença de disfunção motora associada a alterações cognitivas é o principal fator que permite distinguir a HAD de outras demências (182,188).

As alterações comportamentais de indivíduos com HAD incluem mudanças de personalidade, irritabilidade, apatia, redução do contacto social, diminuição da libido e alteração dos padrões de sono. Sintomas depressivos ligeiros a moderados podem

preceder o início da HAD, contudo, a depressão significativa pode confundir o diagnóstico, considerando-se essencial uma abordagem pormenorizada do doente (182,190).

7.2 Distúrbios neurocognitivos menores (ANI e MND)

O ANI e o MND, dois distúrbios neurocognitivos associados à infecção pelo HIV-1, são frequentemente caracterizados por sintomas discretos, por vezes até mesmo impercetíveis, mas que podem afetar a qualidade de vida e a adesão à terapêutica. Os pacientes infetados com o HIV-1 e que apresentam estas perturbações têm geralmente maior dificuldade de concentração, cometem erros frequentes nas atividades realizadas, perdem-se facilmente no pensamento e requerem repetidas solicitações para a execução de tarefas (182). Nestas formas ligeiras de HAND, as dificuldades de concentração, atenção e memória podem estar presentes, mesmo que o exame neurológico não manifeste qualquer alteração. Em geral, as manifestações clínicas são semelhantes às da HAD, mas de menor gravidade (182,191).

7.3 Neuropatia periférica associada ao HIV

A neuropatia sintomática é outra das manifestações clínicas que pode estar associada à infecção pelo HIV-1 e está presente na grande maioria dos pacientes com SIDA em estadio avançado. As queixas mais comuns associadas a esta perturbação incluem: diminuição da sensibilidade, falta de força, redução dos movimentos corporais, parestesias e disestesias dolorosas. O principal sinal neurológico consiste na alteração sensorial simétrica distal nos quatro membros, principalmente nos pés (188).

A etiologia e a patogénese da neuropatia periférica associada ao HIV não estão completamente definidas, mas considera-se que este distúrbio pode ser causado pela ação direta ou indireta do HIV, ou secundário a infeções, efeitos tóxicos provocados por certos fármacos antirretrovirais ou devido a deficiências nutricionais (por exemplo, défice de vitamina B12) (192–194).

8 Conclusões

Mais de 30 anos após ter sido isolado pela primeira vez, o HIV-1 continua a ser um desafio constante para os grupos científicos e clínicos que se dedicam à sua investigação. Apesar de ter sido considerado um vírus neuropatogénico e o agente causal de vários distúrbios neurocognitivos, novos avanços na clínica, nos modelos animais e nas pesquisas *in vitro* continuam a ser imprescindíveis para melhorar a compreensão dos seus efeitos prejudiciais no SNC, bem como para identificar alvos potencialmente promissores para a terapêutica dos HAND.

A introdução da cART permitiu transformar o paradigma da infeção pelo HIV-1, que passou de uma doença fatal para uma infeção crónica controlável. Embora esta terapêutica seja efetiva na supressão viral periférica, o aumento da esperança de vida dos indivíduos infetados poderá estar associado ao surgimento de novas síndromes neurológicas provocadas pelo HIV-1. O que se verifica é que, apesar do declínio significativo das formas mais graves de HAND, nomeadamente a HAD, devido à supressão viral bem-sucedida conseguida pela cART, a prevalência dos distúrbios neurocognitivos ligeiros a moderados está em ascensão. Assim, embora a cART esteja associada a um aumento da taxa de sobrevivência e da vida útil em indivíduos infetados pelo HIV-1, não diminui o risco de desenvolvimento dos sintomas de HAND. Tal facto pode ser explicado pela impossibilidade de os fármacos antirretrovirais eliminarem por completo as partículas virais presentes em regiões de difícil acesso (como o SNC) e que podem fornecer, assim, um reservatório viral latente ou que se replica lentamente.

Uma das características patológicas dos HAND é a disrupção da BHE, que desempenha um papel crítico no processo neurodegenerativo e constitui um passo fundamental da neuroinvasão. A alteração da permeabilidade desta barreira seletiva ocorre em resposta à ação direta do vírus, de proteínas virais e de mediadores pró-inflamatórios, o que facilita a entrada no SNC do vírus livre e de células infetadas pelo HIV-1, nomeadamente o subconjunto de monócitos circulantes $CD_{14}^{low}/CD_{16}^{+}$. Embora já muito se saiba sobre os processos de disseminação viral para o SNC, descobrir componentes mais específicos dos mecanismos associados à disrupção da BHE e ao recrutamento para o SNC é crucial para compreender totalmente o processo de neuroinvasão do HIV-1, assim como para apostar em novas estratégias terapêuticas. Especificamente, sabe-se que as proteínas virais Tat e Gp120 provocam a perturbação

funcional das TJs isoladamente, mas ainda não foram desenvolvidos estudos com combinações destas proteínas. Assim, torna-se indispensável o surgimento de abordagens experimentais que utilizem combinações de componentes com vias já estabelecidas, de forma a detetar possíveis interações ou sinergias entre diferentes mediadores da infecção provocada pelo HIV-1.

Após alcançar o SNC, o HIV-1 apresenta diferentes alvos celulares, sendo que os macrófagos perivasculares e a micróglia são consideradas as principais células que permitem o estabelecimento de infecção produtiva. Embora estas células expressem baixas densidades do recetor CD4 na sua superfície (o que dificulta a entrada e a replicação da maioria das estirpes de HIV-1), em estadios mais avançados da doença verifica-se que as estirpes virais presentes no SNC são geneticamente e biologicamente distintas das encontradas nos tecidos linfoides e outros órgãos, apresentando uma capacidade aumentada para infetar células que expressam baixos níveis de CD4. Estas estirpes macrófago-trópicas, com dependência reduzida relativamente ao complexo recetor, podem evoluir no SNC como consequência da adaptação para o crescimento em macrófagos e micróglia. É este tropismo para macrófagos que determina o neurotropismo do HIV-1. A neuroinflamação persistente induzida pelas células cerebrais infetadas resulta na produção de mediadores inflamatórios neurotóxicos que levam, em última instância, ao surgimento de danos neuronais e comprometimento neurocognitivo. Compreender os mecanismos associados ao neurotropismo e neurovirulência do HIV-1 é essencial no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que inibam a infecção do SNC e que previnam o estabelecimento de lesões neurológicas.

Com o objetivo de avaliar os efeitos prejudiciais do HIV-1 no SNC, e tendo em conta que as experiências *in vitro* e em modelos animais são fundamentais, mas insuficientes para compreender a neuropatogénese viral, têm sido utilizados biomarcadores moleculares e técnicas de neuroimagem de última geração. Pesquisas futuras devem ser desenvolvidas para avaliar se esses marcadores moleculares e de neuroimagem podem servir como ferramentas de prognóstico detetáveis no cérebro humano antes do desenvolvimento de todo o espectro de sintomas neurológicos, permitindo prever o surgimento de distúrbios neurodegenerativos.

Tendo em conta os efeitos devastadores que a infeção pelo HIV-1 pode provocar no SNC e uma vez que a cART não é suficiente para eliminar os sintomas neurológicos em indivíduos infetados, existe uma necessidade crescente de novas estratégias terapêuticas para controlar a longo prazo a patologia neurocognitiva e psicológica associada ao HIV. Por exemplo, as terapias adjuvantes direcionadas para o SNC podem ser uma mais valia para prevenir ou melhorar os HAND quando utilizadas em combinação com a cART. Assim, investigações devem continuar a ser feitas, de modo a obter abordagens terapêuticas que permitam atenuar a replicação viral e as respostas inflamatórias no SNC e que levarão, numa perspetiva otimista, à erradicação dos HAND.

9 Referências Bibliográficas

1. WHO | HIV/AIDS [Internet]. World Health Organization; 2016 [cited 2017 May 22]. Available from: <http://www.who.int/gho/hiv/en/>
2. Fact sheet - Latest statistics on the status of the AIDS epidemic | UNAIDS [Internet]. UNAIDS. 2016 [cited 2017 May 22]. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
3. AIDSinfo | UNAIDS [Internet]. [cited 2017 May 22]. Available from: <http://aidsinfo.unaids.org/>
4. Palacio M, Álvarez S, Muñoz-Fernández MÁ. HIV-1 infection and neurocognitive impairment in the current era. *Rev Med Virol.* 2012;22:33–45.
5. Zhang YL, Ouyang YB, Liu LG, Chen DX. Blood-brain barrier and neuro-AIDS. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:4927–39.
6. Strazza M, Pirrone V, Wigdahl B, Nonnemacher MR. Breaking down the barrier: The effects of HIV-1 on the blood–brain barrier. *Brain Res.* 2011;1399:96–115.
7. McRae M. HIV and viral protein effects on the blood brain barrier. *Tissue Barriers.* 2016;4(1):1–6.
8. Collier L, Oxford J. *Human Virology.* 3th ed. Oxford University Press; 2006. 179-183 p.
9. Wagner EK, Hewlett MJ, Bloom DC, Camerini D. *Basic Virology.* 3th ed. Blackwell Publishing; 2008. 399-410 p.
10. Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev Med Virol.* 2013;23:221–40.
11. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley and Klein's *Microbiology.* 7th ed. McGraw-Hill; 2008. 925-931 p.
12. Altfeld M, Behrens G, Berzow D, Boesecke C, Braun P, Buhk T, et al. HIV book [Internet]. hivbook.com. 2011 [cited 2017 May 26]. Available from: <https://hivbook.com/tag/viral-genome/>
13. Nkeze J, Li L, Benko Z, Li G, Zhao RY. Molecular characterization of HIV-1

- genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biosci.* 2015;5(47):1–13.
14. Hill M, Tachedjian G, Mak J. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res.* 2005;3:73–85.
 15. Rajarapu G. Genes and genome of HIV-1. *J Phylogenetics Evol Biol.* 2014;2(1):1–7.
 16. Aiamkitsumrit B, Sullivan NT, Nonnemacher MR, Pirrone V, Wigdahl B. Chapter four - Human Immunodeficiency Virus Type 1 cellular entry and exit in the T lymphocytic and monocytic compartments: mechanisms and target opportunities during viral disease. Vol. 93, *Advances in Virus Research*. Elsevier Inc.; 2015. 257-311 p.
 17. Rao VR, Ruiz AP, Prasad VR. Viral and cellular factors underlying neuropathogenesis in HIV associated neurocognitive disorders (HAND). *AIDS Res Ther.* 2014;11(13):1–15.
 18. Borggren M, Jansson M. Chapter four - The evolution of HIV-1 interactions with coreceptors and mannose C-type lectin receptors. Vol. 129, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2015. 109-140 p.
 19. Pan X, Baldauf HM, Keppler OT, Fackler OT. Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes. *Cell Res.* 2013;23:876–85.
 20. Didigu CA, Doms RW. Novel approaches to inhibit HIV entry. *Viruses.* 2012;4:309–24.
 21. Joseph SB, Arrildt KT, Sturdevant CB, Swanstrom R. HIV-1 target cells in the CNS. *J Neurovirol.* 2015;21(3):276–89.
 22. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;38:1–6.
 23. Atluri VSR, Hidalgo M, Samikkannu T, Kurapati KRV, Jayant RD, Sagar V, et al. Effect of human immunodeficiency virus on blood-brain barrier integrity and function: an update. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:1–10.
 24. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic B V. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell.* 2015;163(5):1064–78.

25. Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain pericytes as mediators of neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(3):291–304.
26. Persidsky Y, Hill J, Zhang M, Dykstra H, Winfield M, Reichenbach NL, et al. Dysfunction of brain pericytes in chronic neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(4):794–807.
27. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1:223–36.
28. Zlokovic B V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008;57:178–201.
29. Ivey NS, MacLean AG, Lackner AA. AIDS and the blood-brain barrier. *J Neurovirol.* 2009;15(2):111–22.
30. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37:13–25.
31. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014;1–13.
32. Barakat R, Redzic Z. The role of activated microglia and resident macrophages in the neurovascular unit during cerebral ischemia: is the jury still out? *Med Princ Pract.* 2016;25(suppl 1):3–14.
33. Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *J Am Soc Exp Neurother.* 2010;7:354–65.
34. Dunfee R, Thomas ER, Gorry PR, Wang J, Ancuta P, Gabuzda D. Mechanisms of HIV-1 neurotropism. *Curr HIV Res.* 2006;4(3):267–78.
35. Zayyad Z, Spudich S. Neuropathogenesis of HIV: from initial neuroinvasion to HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND). *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015;12:16–24.
36. Miller F, Afonso P V, Gessain A, Ceccaldi P-E. Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence.* 2012;3(2):222–9.
37. Hong S, Banks WA. Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications. *Brain Behav Immun.*

- 2015;45:1–12.
38. Spudich S, González-Scarano F. HIV-1-related central nervous system disease: current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:1–17.
 39. Burdo TH, Soulas C, Orzechowski K, Button J, Krishnan A, Sugimoto C, et al. Increased monocyte turnover from bone marrow correlates with severity of SIV encephalitis and CD163 levels in plasma. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):1–13.
 40. Ellery PJ, Tippet E, Chiu Y-L, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, et al. The CD16⁺ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol.* 2007;178:6581–9.
 41. Carman C V, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.* 2004;167(2):377–88.
 42. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:366–78.
 43. Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812:252–64.
 44. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol.* 2008;9(2):137–45.
 45. Steiner O, Coisne C, Engelhardt B, Lyck R. Comparison of immortalized bEnd5 and primary mouse brain microvascular endothelial cells as in vitro blood–brain barrier models for the study of T cell extravasation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31:315–27.
 46. Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: Leucocyte–endothelial cell crosstalk at the blood–brain barrier: A prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37:24–39.
 47. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.*

- 2007;7:678–89.
48. Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):220–30.
 49. Gras G, Kaul M. Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2010;7(30):1–11.
 50. MacLean AG, Rasmussen TA, Bieniemy D, Lackner AA. Activation of the blood–brain barrier by SIV (simian immunodeficiency virus) requires cell-associated virus and is not restricted to endothelial cell activation. *Biochem Soc Trans*. 2004;32:750–2.
 51. Lindl KA, Marks DR, Kolson DL, Jordan-Sciutto KL. HIV-Associated Neurocognitive Disorder: pathogenesis and therapeutic opportunities. *J NeuroImmune Pharmacol*. 2010;5:294–309.
 52. Nakamuta S, Endo H, Higashi Y, Kousaka A, Yamada H, Yano M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated disruption of tight junction proteins by induction of proteasome-mediated degradation of zonula occludens-1 and -2 in human brain microvascular endothelial cells. *J Neurovirol*. 2008;14:186–95.
 53. Kanmogne GD, Primeaux C, Grammas P. HIV-1 gp120 proteins alter tight junction protein expression and brain endothelial cell permeability: implications for the pathogenesis of HIV-associated dementia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(6):498–505.
 54. Kanmogne GD, Schall K, Leibhart J, Knipe B, Gendelman HE, Persidsky Y. HIV-1 gp120 compromises blood–brain barrier integrity and enhance monocyte migration across blood–brain barrier: implication for viral neuropathogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(1):123–34.
 55. Price TO, Ercal N, Nakaoke R, Banks WA. HIV-1 viral proteins gp120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells. *Brain Res*. 2005;1045:57–63.
 56. Louboutin J-P, Agrawal L, Reyes BAS, Bockstaele EJ Van, Strayer DS. HIV-1 gp120-induced injury to the blood-brain barrier: role of metalloproteinases 2 and 9 and relationship to oxidative stress. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(8):801–16.

57. Pu H, Tian J, Flora G, Lee YW, Nath A, Hennig B, et al. HIV-1 Tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24:224–37.
58. Xu R, Feng X, Xie X, Zhang J, Wu D, Xu L. HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both inhibiting occludin expression and cleaving occludin via matrix metalloproteinase-9. *Brain Res*. 2012;1436:13–9.
59. András IE, Pu H, Tian J, Deli MA, Nath A, Hennig B, et al. Signaling mechanisms of HIV-1 Tat-induced alterations of claudin-5 expression in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:1159–70.
60. Pu H, Tian J, Andras IE, Hayashi K, Flora G, Hennig B, et al. HIV-1 Tat protein-induced alterations of ZO-1 expression are mediated by redox-regulated ERK1/2 activation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:1325–35.
61. Ju SM, Song HY, Lee JA, Lee SJ, Choi SY, Park J. Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF- κ B dependent pathway in human astrocytes. *Exp Mol Med*. 2009;41(2):86–93.
62. Abraham L, Fackler OT. HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Commun Signal*. 2012;10(39):1–11.
63. Acheampong EA, Parveen Z, Muthoga LW, Kalayeh M, Mukhtar M, Pomerantz RJ. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef potently induces apoptosis in primary human brain microvascular endothelial cells via the activation of caspases. *J Virol*. 2005;79(7):4257–69.
64. James T, Nonnemacher MR, Wigdahl B, Krebs FC. Defining the roles for Vpr in HIV-1-associated neuropathogenesis. *J Neurovirol*. 2016;1–13.
65. Ferrucci A, Nonnemacher MR, Wigdahl B. Extracellular HIV-1 viral protein R affects astrocytic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity and neuronal survival. *J Neurovirol*. 2013;19(3):239–53.
66. Pazare AR. HIV in cerebrospinal fluid and central nervous system. *J Assoc Physicians India*. 2017;65:11–2.
67. Almeida SM, Rotta I, Ribeiro CE, Oliveira MF, Chaillon A, Pereira AP, et al. Dynamic of CSF and serum biomarkers in HIV-1 subtype C encephalitis with CNS genetic compartmentalization—case study. *J Neurovirol*. 2017;1–14.

68. Almeida SM. Cerebrospinal fluid analysis in the HIV infection and compartmentalization of HIV in the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015;73(7):624–9.
69. Schnell G, Spudich S, Harrington P, Price RW, Swanstrom R. Compartmentalized Human Immunodeficiency Virus type 1 originates from long-lived cells in some subjects with HIV-1 – associated dementia. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):1–13.
70. Harrington PR, Schnell G, Letendre SL, Ritola K, Robertson K, Hall C, et al. Cross-sectional characterization of HIV-1 env compartmentalization in cerebrospinal fluid over the full disease course. *AIDS.* 2009;23(8):907–15.
71. Scutari R, Alteri C, Perno CF, Svicher V, Aquaro S. The role of HIV infection in neurologic injury. *Brain Sci.* 2017;7(38):1–17.
72. V  rollet C, Cabec V, Maridonneau-Parini I. HIV-1 infection of T lymphocytes and macrophages affects their migration via Nef. *Front Immunol.* 2015;6:1–6.
73. Kumar A, Herbein G. The macrophage: a therapeutic target in HIV-1 infection. *Mol Cell Ther.* 2014;2(10):1–15.
74. Chauhan A, Khandkar M. Endocytosis of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) in astrocytes: A fiery path to its destination. *Microb Pathog.* 2015;78:1–6.
75. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Mehler MF, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-). 2010;330(6005):841–5.
76. Gorry PR, Bristol G, Zack JA, Ritola K, Swanstrom R, Birch CJ, et al. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates from brain and lymphoid tissues predicts neurotropism independent of coreceptor specificity. *J Virol.* 2001;75(21):10073–89.
77. Jayakumar P, Berger I, Autschbach F, Weinstein M, Funke B, Verdin E, et al. Tissue-resident macrophages are productively infected ex vivo by primary X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2005;79(8):5220–6.
78. Yi Y, Chen W, Frank I, Cutilli J, Singh A, Starr-Spires L, et al. An unusual syncytia-inducing human immunodeficiency virus type 1 primary isolate from

- the central nervous system that is restricted to CXCR4 , replicates efficiently in macrophages , and induces neuronal apoptosis. *J Neurovirol.* 2003;9:432–41.
79. Joseph SB, Arrildt KT, Swanstrom AE, Schnell G, Lee B, Hoxie JA, et al. Quantification of entry phenotypes of macrophage-tropic HIV-1 across a wide range of CD4 densities. *J Virol.* 2014;88(4):1858–69.
 80. Martín-García J, Cao W, Varela-Rohena A, Plassmeyer ML, González-Scarano F. HIV-1 tropism for the central nervous system: Brain-derived envelope glycoproteins with lower CD4 dependence and reduced sensitivity to a fusion inhibitor. *Virology.* 2006;346:169–79.
 81. Peters PJ, Bhattacharya J, Hibbitts S, Dittmar MT, Simmons G, Bell J, et al. Biological analysis of human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes amplified from brain and lymph node tissues of AIDS patients with neuropathology reveals two distinct tropism phenotypes and identifies envelopes in the brain that confer an enhanced . *J Virol.* 2004;78(13):6915–26.
 82. Shieh JTC, Martín J, Baltuch G, Malim MH, González-Scarano F. Determinants of syncytium formation in microglia by human immunodeficiency virus type 1: Role of the V1/V2 domains. *J Virol.* 2000;74(2):693–701.
 83. Puffer BA, Altamura LA, Pierson TC, Doms RW. Determinants within gp120 and gp41 contribute to CD4 independence of SIV Envs. *Virology.* 2004;327:16–25.
 84. Babas T, Muñoz D, Mankowski JL, Tarwater PM, Clements JE, Zink MC. Role of microglial cells in selective replication of simian immunodeficiency virus genotypes in the brain. *J Virol.* 2003;77(1):208–16.
 85. Chauhan A, Tikoo A, Patel J, Abdullah AM. HIV-1 endocytosis in astrocytes: A kiss of death or survival of the fittest? *Neurosci Res.* 2014;88:16–22.
 86. Schweighardt B, Atwood WJ. HIV type 1 infection of human astrocytes is restricted by inefficient viral entry. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001;17(12):1133–42.
 87. Chauhan A. Unperturbed posttranscriptional regulatory Rev protein function and HIV-1 replication in astrocytes. *PLoS One.* 2014;9(9):1–16.
 88. Chauhan A, Mehla R, Vijayakumar TS, Handy I. Endocytosis-mediated HIV-1

- entry and its significance in the elusive behavior of the virus in astrocytes. *Virology*. 2014;0:1–19.
89. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:857–902.
 90. Gorvel J-P, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*. 1991;64:915–25.
 91. Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, Deurs B. Rab7: A key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 2000;11:467–80.
 92. Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG. Rab 11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*. 1996;135(4):913–24.
 93. Mainou BA, Dermody TS. Transport to late endosomes is required for efficient reovirus infection. *J Virol*. 2012;86(16):8346–58.
 94. Macovei A, Petrareanu C, Lazar C, Florian P, Branza-Nichita N. Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment. *J Virol*. 2013;87(11):6415–27.
 95. Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*. 2006;439:998–1003.
 96. Smith AL, Ganesh L, Leung K, Jongstra-Bilen J, Jongstra J, Nabel GJ. Leukocyte-specific protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):421–30.
 97. Vijaykumar TS, Nath A, Chauhan A. Chloroquine mediated molecular tuning of astrocytes for enhanced permissiveness to HIV infection. *Virology*. 2008;381(1):1–5.
 98. Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, et al. HIV-1 suppressive sequences are modulated by Rev transport of unspliced RNA and are required for efficient HIV-1 production. *PLoS One*. 2012;7(12):1–18.
 99. Vincendeau M, Kramer S, Hadian K, Rothenaigner I, Bell J, Hauck SM, et al. Control of HIV replication in astrocytes by a family of highly conserved host proteins with a common Rev-interacting domain (Risp). *AIDS*. 2010;24(16):2433–42.

100. Gagnol A, Lainé S, Clerzius G. Dual role of TRBP in HIV replication and RNA interference: viral diversion of a cellular pathway or evasion from antiviral immunity? *Retrovirology*. 2005;2(65):1–6.
101. Sanghvi VR, Steel LF. The cellular TAR RNA Binding Protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *J Virol*. 2011;85(23):12614–21.
102. Ong CL, Thorpe JC, Gorry PR, Bannwarth S, Jaworowski A, Howard JL, et al. Low TRBP levels support an innate human immunodeficiency virus type 1 resistance in astrocytes by enhancing the PKR antiviral response. *J Virol*. 2005;79(20):12763–72.
103. Kovalevich J, Langford D. Neuronal toxicity in HIV CNS disease. *Future Virol*. 2012;7(7):687–98.
104. González-Scarano F, Martín-García J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:69–81.
105. Kaul M, Zheng J, Okamoto S, Gendelman HE, Lipton SA. HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system. *Cell Death Differ*. 2005;12:878–92.
106. Almeida SM. Cognitive impairment and major depressive disorder in HIV infection and cerebrospinal fluid biomarkers. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013;71(9–B):689–92.
107. Lannuzel A, Lledo P-M, Lamghitnia HO, Vincent J-D, Tardieu M. HIV-1 envelope proteins gp120 and gp160 potentiate NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase, alter $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and induce neurotoxicity in human embryonic neurons. *Eur J Neurosci*. 1995;7:2285–93.
108. Catani MV, Corasaniti MT, Navarra M, Nisticò G, Finazzi-Agrò A, Melino G. gp120 induces cell death in human neuroblastoma cells through the CXCR4 and CCR5 chemokine receptors. *J Neurochem*. 2000;74(6):2373–9.
109. Kaul M, Lipton SA. Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:8212–6.
110. Ballester LY, Capó-Vélez CM, García-Beltrán WF, Ramos FM, Vázquez-Rosa E, Ríos R, et al. Up-regulation of the neuronal nicotinic receptor $\alpha 7$ by HIV

- glycoprotein 120. *J Biol Chem.* 2012;287(5):3079–86.
111. Nath A, Psooy K, Martin C, Knudsen B, Magnuson DSK, Haughey N, et al. Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. *J Virol.* 1996;70(3):1475–80.
 112. Haughey NJ, Holden CP, Nath A, Geiger JD. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-regulated stores of intracellular calcium in calcium dysregulation and neuron cell death caused by HIV-1 protein Tat. *J Neurochem.* 1999;73(4):1363–74.
 113. Hayashi H, Campenot RB, Vance DE, Vance JE. Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *J Neurosci.* 2007;27(8):1933–41.
 114. Liu Y, Jones M, Hingtgen CM, Bu G, Laribee N, Tanzi RE, et al. Uptake of HIV-1 Tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med.* 2000;6(12):1380–7.
 115. Eugenin EA, King JE, Nath A, Calderon TM, Zukin RS, Bennett MVL, et al. HIV-tat induces formation of an LRP – PSD-95 – NMDAR – nNOS complex that promotes apoptosis in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(9):3438–43.
 116. Zhu J, Ananthan S, Mactutus CF, Booze RM. Recombinant HIV-1 TAT1-86 allosterically modulates dopamine transporter activity. *Synapse.* 2011;65(11):1251–4.
 117. Chang L, Wang GJ, Volkow ND, Ernst T, Telang F, Logan J, et al. Decreased brain dopamine transporters are related to cognitive deficits in HIV patients with or without cocaine abuse. *Neuroimage.* 2008;42(2):869–78.
 118. Chang JR, Mukerjee R, Bagashev A, Valle L, Chabrashvili T, Hawkins BJ, et al. HIV-1 Tat protein promotes neuronal dysfunction through disruption of microRNAs. *J Biol Chem.* 2011;286(47):41125–34.
 119. Albright A V, Soldan SS, González-Scarano F. Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol.*

- 2003;9:222–7.
120. Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, et al. Tumor necrosis factor α inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes: Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol Chem*. 1996;271(26):15303–6.
 121. Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, et al. IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem*. 2013;125(6):897–908.
 122. Vergote D, Butler GS, Ooms M, Cox JH, Silva C, Hollenberg MD, et al. Proteolytic processing of SDF-1 α reveals a change in receptor specificity mediating HIV-associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(50):19182–7.
 123. Sui Y, Stehno-Bittel L, Li S, Loganathan R, Dhillon NK, Pinson D, et al. CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. *Eur J Neurosci*. 2006;23:957–64.
 124. Kelder W, McArthur JC, Nance-Sproson T, McClernon D, Griffin DE. β -chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*. 1998;44(5):831–5.
 125. Schmidtayerova H, Sherry B, Bukrinsky M. Chemokines and HIV replication. *Nature*. 1996;382:767.
 126. Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Bushell TJ, Gray PW, Miller RJ. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:14500–5.
 127. Ragin AB, Wu Y, Storey P, Cohen BA, Edelman RR, Epstein LG. Monocyte chemoattractant protein-1 correlates with subcortical brain injury in HIV infection. *Neurology*. 2006;66(8):1255–7.
 128. Pereira CF, Middel J, Jansen G, Verhoef J, Nottet HSLM. Enhanced expression of fractalkine in HIV-1 associated dementia. *J Neuroimmunol*. 2001;115:168–75.
 129. Ancuta P, Moses A, Gabuzda D. Transendothelial migration of CD16+

- monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology*. 2004;209:11–20.
130. Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res*. 2003;979:65–70.
 131. Jiang ZG, Piggee C, Heyes MP, Murphy C, Quearry B, Bauer M, et al. Glutamate is a mediator of neurotoxicity in secretions of activated HIV-1-infected macrophages. *J Neuroimmunol*. 2001;117:97–107.
 132. O'Donnell LA, Agrawal A, Jordan-Sciutto KL, Dichter MA, Lynch DR, Kolson DL. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-induced neurotoxicity: Roles for the NMDA receptor subtypes 2A and 2B and the calcium-activated protease calpain by a CSF-derived HIV-1 strain. *J Neurosci*. 2006;26(3):981–90.
 133. Gegelashvili G, Schousboe A. High affinity glutamate transporters: Regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol*. 1997;52:6–15.
 134. Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*. 2001;410:988–94.
 135. Sacktor N, Haughey N, Cutler R, Tamara A, Turchan J, Pardo C, et al. Novel markers of oxidative stress in actively progressive HIV dementia. *J Neuroimmunol*. 2004;157:176–84.
 136. Turchan J, Pocernich CB, Gairola C, Chauhan A, Schifitto G, Butterfield DA, et al. Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants. *Neurology*. 2003;60:307–14.
 137. El-Hage N, Podhaizer EM, Sturgill J, Hauser KF. Toll-like receptor expression and activation in astroglia: differential regulation by HIV-1 Tat, gp120, and morphine. *Immunol Invest*. 2011;40(5):498–522.
 138. Fan Y, He JJ. HIV-1 Tat induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum stress in astrocytes and causes neurotoxicity through GFAP activation and aggregation. *J Biol Chem*. 2016;291:22819–29.
 139. Berman JW, Carvallo L, Buckner CM, Luers A, Prevedel L, Bennett M V. HIV-tat alters Connexin43 expression and trafficking in human astrocytes: role in NeuroAIDS. *J Neuroinflammation*. 2016;13(54):1–11.

140. Guha D, Nagilla P, Redinger C, Srinivasan A, Schatten GP. Neuronal apoptosis by HIV-1 Vpr: contribution of proinflammatory molecular networks from infected target cells. *J Neuroinflammation*. 2012;9(138):1–15.
141. Gardoni F, Marcello E, Di Luca M. Postsynaptic density-membrane associated guanylate kinase proteins (PSD-MAGUKs) and their role in CNS disorders. *Neuroscience*. 2009;158:324–33.
142. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4(11):1313–7.
143. Revest J-M, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza P-V, et al. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry*. 2009;14:959–67.
144. Chen Q, Nakajima A, Choi SH, Xiong X, Sisodia SS, Tang Y-P. Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2008;29(2):316–26.
145. Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:368–78.
146. Jordan-Sciutto KL, Wang G, Murphey-Corb M, Wiley CA. Cell cycle proteins exhibit altered expression patterns in lentiviral-associated encephalitis. *J Neurosci*. 2002;22(6):2185–95.
147. Karl C, Couillard-Despres S, Prang P, Munding M, Kilb W, Brigadski T, et al. Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence. *J Neurochem*. 2005;92:264–82.
148. Plum L, Schubert M, Bruning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(2):59–65.
149. Carper MJ, Cade WT, Cam M, Zhang S, Shalev A, Yarasheski KE, et al. HIV-protease inhibitors induce expression of suppressor of cytokine signaling-1 in insulin-sensitive tissues and promote insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(3):E558–67.
150. Hardy H, Esch LD, Morse GD. Glucose disorders associated with HIV and its drug therapy. *Ann Pharmacother*. 2001;35:343–51.

151. Dinges WL, Chen D, Snell PG, Weatherall PT, Peterson DM, Garg A. Regional body fat distribution in HIV-infected patients with lipodystrophy. *J Investig Med*. 2005;53:15–25.
152. Hughes CA, Cashin RP, Eurich DT, Houston S. Risk factors for new-onset diabetes mellitus in patients receiving protease inhibitor therapy. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(4):230–2.
153. Neye Y, Dufer M, Drews G, Krippeit-Drews P. HIV protease inhibitors: Suppression of insulin secretion by inhibition of voltage-dependent K⁺ currents and anion currents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316:106–12.
154. Tschritter O, Machicao F, Stefan N, Schafer S, Weigert C, Staiger H, et al. A new variant in the human Kv1.3 gene is associated with low insulin sensitivity and impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(2):654–8.
155. Allers K, Schneider T. CCR5 Δ 32 mutation and HIV infection: basis for curative HIV therapy. *Curr Opin Virol*. 2015;14:24–9.
156. Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, et al. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med*. 1998;4(3):350–3.
157. Singh KK, Ellis RJ, Marquie-Beck J, Letendre S, Heaton RK, Grant I, et al. CCR2 polymorphisms affect neuropsychological impairment in HIV-1-infected adults. *J Neuroimmunol*. 2004;157:185–92.
158. Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummidi S, et al. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(21):13795–800.
159. Hu G, Yang L, Cai Y, Niu F, Mezzacappa F, Callen S, et al. Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders: focus on HIV-associated neurological complications. *Cell Death Dis*. 2016;7:1–12.
160. Soria FN, Pampliega O, Bourdenx M, Meissner WG, Bezard E, Dehay B. Exosomes, an unmasked culprit in neurodegenerative diseases. *Front Neurosci*. 2017;11:1–12.
161. Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in

- normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol.* 2015;6:1–12.
162. Schneider A, Simons M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res.* 2013;352:33–47.
 163. Jan AT, Malik MA, Rahman S, Yeo HR, Lee EJ, Abdullah TS, et al. Perspective insights of exosomes in neurodegenerative diseases: A critical appraisal. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:1–8.
 164. Sarko DK, McKinney CE. Exosomes: Origins and therapeutic potential for neurodegenerative disease. *Front Neurosci.* 2017;11:1–7.
 165. Przedborski S, Masliah E, Cosentino M. *Neuroimmune Pharmacology*. 2nd ed. Ikezu T, Gendelman HE, editors. Springer; 2017. 318-320 p.
 166. Kadiu I, Gendelman HE. Human immunodeficiency virus type 1 endocytic trafficking through macrophage bridging conduits facilitates spread of infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2011;6:658–75.
 167. Kadiu I, Narayanasamy P, Dash PK, Zhang W, Gendelman HE. Biochemical and biologic characterization of exosomes and microvesicles as facilitators of HIV-1 infection in macrophages. *J Immunol.* 2012;189(2):744–54.
 168. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JEK. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem.* 2003;278(52):52347–54.
 169. Li M, Aliotta JM, Asara JM, Tucker L, Quesenberry P, Lally M, et al. Quantitative proteomic analysis of exosomes from HIV-1 infected lymphocytic cells. *J Proteomics.* 2012;12(13):1–16.
 170. Campbell TD, Khan M, Huang M-B, Bond VC, Powell MD. HIV-1 Nef protein is secreted into vesicles that can fuse with target cells and virions. *Ethn Dis.* 2008;18(2 0 2):S2-14–9.
 171. Rahimian P, He JJ. Exosome-associated release, uptake, and neurotoxicity of HIV-1 Tat protein. *J Neurovirol.* 2016;
 172. Hu G, Yao H, Chaudhuri AD, Duan M, Yelamanchili S V, Wen H, et al.

- Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated neuronal dysfunction. *Cell Death Dis.* 2012;3:1–10.
173. Yelamanchili S V, Lamberty BG, Rennard DA, Morsey BM, Hochfelder CG, Meays BM, et al. MiR-21 in extracellular vesicles leads to neurotoxicity via TLR7 signaling in SIV neurological disease. *PLoS Pathog.* 2015;11(7):1–22.
 174. Tambussi G, Gori A, Capiluppi B, Balotta C, Papagno L, Morandini B, et al. Neurological symptoms during primary human immunodeficiency virus (HIV) infection correlate with high levels of HIV RNA in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 2000;30:962–5.
 175. Cinque P, Brew BJ, Gisslen M, Hagberg L, Price RW. Chapter 17 - Cerebrospinal fluid markers in central nervous system HIV infection and AIDS dementia complex. In: Portegies P, Berger JR, editors. *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2007. p. 261–300.
 176. Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, Brew BJ, Spudich S, Bestetti A, et al. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS Res Ther.* 2010;7(15):1–12.
 177. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim E-Y, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One.* 2008;3(6):1–12.
 178. Krut JJ, Mellberg T, Price RW, Hagberg L, Fuchs D, Rosengren L, et al. Biomarker evidence of axonal injury in neuroasymptomatic HIV-1 patients. *PLoS One.* 2014;9(2):1–7.
 179. Hudson CL, Zemlin AE, Ipp H. The cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine is elevated in asymptomatic, untreated HIV-1 infection and correlates with markers of immune activation and disease progression. *Ann Clin Biochem.* 2014;51(5):568–75.
 180. Ances BM, Hammoud DA. Neuroimaging of HIV Associated Neurocognitive Disorders (HAND). *Curr Opin HIV AIDS.* 2014;9(6):545–51.
 181. Meyerhoff DJ, MacKay S, Poole N, Dillon WP, Weiner MW, Fein G. N-Acetylaspartate reductions measured by 1H MRSI in cognitively impaired HIV-seropositive individuals. *Magn Reson Imaging.* 1994;12(4):653–9.

182. Benea CL, Petrescu A-M. Chapter 2: HIV Encephalopathy – Now and Then. In: Tanasescu R, editor. *Miscellanea on Encephalopathies*. InTech; 2012. p. 19–54.
183. Meyerhoff DJ, Bloomer C, Cardenas V, Norman D, Weiner MW, Fein G. Elevated subcortical choline metabolites in cognitively and clinically asymptomatic HIV+ patients. *Am Acad Neurol*. 1999;52:995–1003.
184. Thurnher MM, Castillo M, Stadler A, Rieger A, Schmid B, Sundgren PC. Diffusion-Tensor MR Imaging of the Brain in Human Immunodeficiency Virus – Positive Patients. *Am J Neuroradiol*. 2005;26:2275–81.
185. Ances BM, Vaida F, Yeh MJ, Liang CL, Buxton RB, Letendre S, et al. HIV and aging independently affect brain function as measured by functional magnetic resonance imaging. *J Infect Dis*. 2010;201(3):336–40.
186. Valcour V, Sithinamsuwan P, Letendre S, Ances B. Pathogenesis of HIV in the central nervous system. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011;8:54–61.
187. Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, McCutchan JA, Letendre SL, LeBlanc S, et al. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol*. 2011;17:3–16.
188. Basri R, Majdiah WMW. Chapter 8: Neurological manifestations of HIV-1 infection and markers for HIV progression. In: Saxena SK, editor. *Current Perspectives in HIV Infection*. Edited Vol. InTech; 2013. p. 137–60.
189. Woods SP, Morgan EE, Dawson M, Scott JC, Grant I. Action (Verb) fluency predicts dependence in instrumental activities of daily living in persons infected with HIV-1. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2006;28:1030–42.
190. Stern Y, McDermott MP, Albert S, Palumbo D, Selnes OA, McArthur J, et al. Factors associated with incident human immunodeficiency virus-dementia. *Arch Neurol*. 2001;58:473–9.
191. Ances BM, Ellis RJ. Dementia and neurocognitive disorders due to HIV-1 infection. *Semin Neurol*. 2007;27(1):86–92.
192. Rizzuto N, Cavallaro T, Monaco S, Morbin M, Bonetti B, Ferrari S, et al. Role of HIV in the pathogenesis of distal symmetrical peripheral neuropathy. *Acta Neuropathol*. 1995;90:244–50.

193. Nakamoto BK, McMurtray A, Davis J, Valcour V, Watters MR, Shiramizu B, et al. Incident neuropathy in HIV-infected patients on HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(7):759–65.
194. Tang AM, Graham NMH, Chandra RK, Saah AJ. Low serum vitamin B-12 concentrations are associated with faster Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) disease progression. *J Nutr*. 1997;127:345–51.